Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Graumann

Pharmakologische Untersuchung der Ca**-Ausschüttung in embryonalen Zellen des Hühnchens nach Reizung des muskarinischen Rezeptors – mit Hilfe der CTC-Fluoreszenzmethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gisa Irmgard Hartung, geb. Wintzer
aus Merseburg

1984

UNIV.
LEIDEN
ZOOL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536514_0007

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Graumann

Pharmakologische Untersuchung der Ca**-Ausschüttung in embryonalen Zellen des Hühnchens nach Reizung des muskarinischen Rezeptors – mit Hilfe der CTC-Fluoreszenzmethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gisa Irmgard Hartung, geb. Wintzer
aus Merseburg

1984

Dekan: Prof. Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Drews
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. M. Albinus

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Die Grundideen zu meiner Dissertation verdanke ich Herrn Prof. Dr. U. Drews.

Um den Fortgang der Forschungsarbeiten und der damit verbundenen Experimente zu gewährleisten, war ein umfangreicher Gedankenaustausch erforderlich, der schließlich zu den gewonnenen Erkenntnissen führte. Für die wertvollen Impulse und die ständige Diskussionsbereitschaft, möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Drews meinen besonderen Dank aussprechen.

Auch Herrn Prof. Dr. A. Wagner gebührt mein Dank für die anregende Diskussion hinsichtlich der chemischen Beurteilung der eingesetzten Pharmaka.

Herr Dr. H. Schmidt, der die Einweisung in die Methode durchführte, und die Mitarbeiter des Anatomischen Institutes der Universität Tübingen, die mit meiner Arbeit befaßt waren, möchte ich ebenfalls an dieser Stelle herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Das muskarinische cholinerge System	1
1.2.	Die Darstellung der Ca^{++}-Ausschüttung mit CTC	1
1.3.	Der Nachweis von Ca^{++}-Bewegungen nach Reizung membrangebundener Rezeptoren	3
2.	Material und Methode	6
2.1.	Gewinnung der Hühnerembryonen	6
2.2.	Herstellung der Zellsuspension	6
2.2.1.	Aus ganzen Embryonen	6
2.2.2.	Aus Extremitätenknospen	7
2.2.3.	Aus Embryonen ohne Extremitätenknospen	7
2.3.	Weitere in den Vorversuchen verwendete Isolationsmethoden	7
2.3.1.	EGTA-Methode	7
2.3.2.	Trypsin-Methode	8
2.4.	Färbevorgang	9
2.5.	Meßanordnung	10
2.6.	Reagenzien	11
2.6.1.	Zur Herstellung der Zellsuspension	11
2.6.2.	Pharmaka	11
3.	Ergebnisse	13
3.1.	Vorversuche zur Optimierung der Methode	13
3.1.1.	Schonende Isolation der Zellen	13
3.1.2.	Verlängerung der Lebensdauer der Zellen durch geeignete Lagerung und Aufbewahrung in einer Nährlösung bis zum Versuchsbeginn	15

Seite

3.1.3. Optimierung des Färbevorganges 18
3.1.4. Geeignetes Meßmedium 19

3.2. Cholinerge Substanzen, Pharmaka 23

3.2.1. Reizung mit Acetylcholin 23
3.2.2. Konzentrationsabhängige Abstufung der Acetylcholinreaktion 24
3.2.3. Reizung mit wirksamen muskarinischen Agonisten 26

3.2.3.a. Acetyl-ß-methylcholin, Carbachol 26
3.2.3.b. Konzentrationsabhängige Abstufung der Reaktionskurven von wirksamen Agonisten 26

3.2.4. Reizung mit unwirksamen muskarinischen Agonisten 29

3.2.4.a. Arecolin, Bethanechol, Oxotremorin 29

3.2.5. Blockierung der Acetylcholinreaktion durch muskarinische Antagonisten 31

a. Atropin
b. Scopolamin
c. L-Quinuclidinyl Benzilat (QNB)
d. Dexetimid
e. Pirenzepin

3.2.6. Blockierung der Reaktion von Agonisten durch die muskarinischen Antagonisten a-e von 3.2.5. 34
3.2.7. Beeinflussen nikotinische Agonisten und Antagonisten die Reaktion am Muskarinrezeptor? 38

4. Diskussion 41
==========

5. Zusammenfassung 53
==========

6. Literatur 55
==========

Einleitung

1.1. Das muskarinische cholinerge System embryonaler Zellen

In embryonalen Zellen ist ein muskarinisches cholinerges System vorhanden, von dem zunächst nur die Cholinesterase beschrieben wurde (Drews U., Schröder Ch., Schmidt H. 1980). Wegen des vorübergehenden Erscheinens der Cholinesterase während der Morphogenese haben Drews et. al. (1967) angenommen, daß die Cholinesterase eine Funktion in der Regulation der embryonalen Entwicklung innehat. In der zusammenfassenden Darstellung nannte Drews (1975) dieses Enzym "embryonale Cholinesterase".

Durch Bindungsstudien gelang es Schmidt (1981) einen Acetylcholin-Rezeptor von muskarinischer Natur zu identifizieren und zwar an cholinesteraseaktiven Zellen der Extremitätenknospen des Hühnchens. Die Cholinesterase, die bei morphogenetischen Prozessen auftritt, wurde im Seeigel von Ozaki (1976) und in der Hühnerextremitätenknospe von Schröder (1980) biochemisch charakterisiert. Acetylcholin wurde von Fluck (1978) im Fischembryo nachgewiesen. Nach Reizung des muskarinischen Rezeptors mit Acetylcholin reagieren die embryonalen Zellen mit einer Ca^{++}-Ausschüttung (Kaufenstein 1983).

Das Ziel meiner Arbeit ist, diese Ca^{++}-Ausschüttung an embryonalen Zellen nach Reizung des muskarinischen Rezeptors pharmakologisch zu charakterisieren.

1.2. Die Darstellung der Ca^{++}-Ausschüttung mit Chlortetracyclin (CTC)

Eine intrazelluläre Ca^{++}-Verschiebung läßt sich mit Chlortetracyclin spektralfluorometrisch darstellen (Caswell 1972). Die fluoreszierende Verbindung ist ein Chelatkomplex, der zwischen dem Chlortetracyclin und dem Ca^{++} entsteht. Der Vorteil dieser Methode gegenüber Messungen mit radioaktiven $^{45}Ca^{++}$ besteht darin, daß eine kontinuierliche Beobachtung der Ca^{++}-Verschiebung in der Zelle möglich ist. Die Fluoreszenz des Ca-CTC-Komplexes

ist in der Lipidphase wesentlich intensiver als in wässrigem Medium.

Der fluoreszierende Komplex bildet sich nicht nur mit Ca^{++}, sondern auch mit Mg^{++}. Die Differenzierung dieser Komplexe ist aber möglich, da diese unterschiedliche Fluoreszenzspektren haben. Mit der CTC-Fluoreszenzmethode wird im wesentlichen das an Membranen in der Lipidphase vorkommende Ca^{++} erfaßt. Im Excitationsspektrum liegt das Maximum des Ca^{++}-Komplexes bei 390 nm (Caswell 1972), im Emissionsspektrum bei 530 nm (Caswell & Hutchison 1971 b). Die Intensität der Fluoreszenz des Ca-CTC-Komplexes einer Membranfraktion ist um ca. 65 % höher, als die des Mg-CTC-Komplexes (Hellett et al. 1972). Luthra und Olson fanden (1976), daß die Fluoreszenz des Chlortetracyclin den Gehalt an membrangebundenem Ca^{++} (hauptsächlich intramitochondrial) anzeigt. Die Affinität von Chlortetracyclin ist für Ca^{++} auf Membranoberflächen drei Mal höher als für Mg^{++} (Caswell 1979).

Das Excitationsspektrum zeigt für Mg^{++} das Maximum bei 375 nm (Caswell 1972), im Emissionsspektrum liegt es bei 520 nm (Caswell & Hutchison 1971 b). Dieser Unterschied der Ca^{++}-Mg^{++}-Spektren wurde in Methanol beobachtet.

Mit Hilfe des Chlortetracyclins hat Caswell (1972) die Bewegung von zweiwertigen Kationen, vor allem Ca^{++}, in Mitochondrien von Rattenleber nachgewiesen. Das Chlortetracyclin zeigt eine hohe Fluoreszenz in Anwesenheit von Mitrochondrien, welche darauf zurückzuführen ist, daß das Chlortetracyclin mit dem membrangebundenen Ca^{++} einen Komplex bildet.

Babcock et al. wiesen Ca^{++} (1979) auch in intakten Hepatozyten der Ratte nach. Sie verglichen die Fluoreszenzintensität einer Mitochondrienfraktion, einer Mikrosomenfraktion und einer Zellsuspension. Die Fraktionen der isolierten Mitochondrien hatte die weitaus größte Intensität, dagegen wies die Mikrosomenfraktion kaum eine Fluoreszenz auf. Die Fluoreszenz der Zellsuspension lag zwischen diesen

beiden Extremwerten. Dies entspricht den bereits früher gemachten Beobachtungen (Du Buy & Showacre 1961, Allison & Young 1964, Chandler & Williams 1978), daß die CTC-Fluoreszenz und damit die größte Menge des intrazellulären Ca^{++} in den Mitochondrien lokalisiert ist.

1.3. Der Nachweis von Ca^{++}-Bewegungen nach Reizung membrangebundener Rezeptoren

Nach Stimulation intakter Kaninchen-Thymozyten mit Concanavalin A konnten Mikkelsen & Schmidt-Ullrich (1980) eine Ca^{++}-Verschiebung mit der CTC-Fluoreszenzmethode nachweisen. Sie stellten eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von $1,0 \times 10^7$ Zellen/ml her und inkubierten diese mit Chlortetracyclin. Nach Zugabe von Concanavalin A kam es zur Fluoreszenzintensitätsminderung. Die Steigung der Intensitätskurve nahm nach 5 Minuten wieder den Wert einer ungereizten Zellsuspension an, nur auf einem niedrigeren Intensitätsniveau. Sie konnten weiterhin zeigen, daß der Fluoreszenzintensitätsabfall korreliert mit der Konzentration des Concanavalin A.

In den verwendeten Konzentrationen hatte das Concanavalin A keinen Einfluß auf den Einstrom extrazellulären Calciums in die intakten Zellen oder auf Ca^{++}-Bewegungen an isolierten Membranvesikeln. Das wiesen Mikkelsen & Schmidt-Ullrich durch Messungen mit $^{45}Ca^{++}$ nach. Es erfolgte jedoch ein Ausstrom von $^{45}Ca^{++}$ aus den intakten Zellen, parallel zur Reizung mit Concanavalin A nahm die CTC-Fluoreszenz ab. Beide Vorgänge, sowohl die $^{45}Ca^{++}$-Freisetzung als auch die Fluoreszenzintensitätsminderung, konnten durch Antimycin vollständig gehemmt werden. Eine Fluoreszenzabnahme nach Reizung mit Concanavalin A konnte an isolierten Mitochondrien aus Thymozyten nicht nachgewiesen werden. So führt die Reizung der Zellen mit Concanavalin A über einen Rezeptor auf der Zellmembran oder über eine direkte Interaktion nach Lectin-Phagozytose zu einer intrazellulären Ca^{++}-Freisetzung.

Noradrenalin induzierte, wie alle Katecholamine, über einen adrenergen Rezeptor an der Leberzelle die Glukoneogenese (Blackmore et al. 1978) und setzt dabei intrazelluläres Ca^{++} frei (Chen, Babcock and Lardy 1978). Diese Ca^{++}-Verschiebung konnte Babcock et al. mit der CTC-Fluoreszenzmethode nachweisen. Weiterhin wurde die Reaktion der Zellen auf Zugabe von Ionophor A 23187, das den Ca^{++}-Durchstrom durch Membranen frei ermöglicht, untersucht. Es ergab sich eine Intensitätsabnahme der Fluoreszenz, sowohl nach Zugabe von Ionophor A 23187 als auch nach Noradrenalin, wobei der Abfall auf das Ionophor A 23187 wesentlich deutlicher war als auf Noradrenalin. Die Reaktionen ließen sich an der gleichen Zellsuspension auslösen. Es spielte dabei keine Rolle welche Substanz der Suspension zuerst zugegeben wurde (Chen, Babcock and Lardy 1978).

An Zellsuspensionen aus embryonalen Zellen des Hühnchens wies Kaufenstein (1983) mit der CTC-Fluoreszenzmethode Ca^{++}-Bewegungen nach. Zur Herstellung der Zellsuspensionen verwandte er ganze Embryonen, die sich im Entwicklungsstadium 23/24 nach Hamburger & Hamilton (1951) befanden. In diesem Stadium gibt es eine große Zahl Organanlagen, die eine hohe embryonale Cholinesterase-Aktivität aufweisen (Drews 1975). Kaufenstein erhielt in seinen Versuchen nach Zugabe von Acetylcholin eine Minderung der Fluoreszenzintensität, die sich durch Atropin hemmen ließ. Diese Hemmung durch Atropin zeigt, daß es sich um eine Reizung am muskarinischen embryonalen Rezeptor handelt.

Zu gleichen Ergebnissen kam er bei Messungen an Zellsuspensionen aus Extremitätenknospen des Hühnchens im Stadium 23/24 Hamburger & Hamilton (1951). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich weder Neuroblasten noch Myoblasten in der Extremitätenknospe. Drews und Drews fanden (1972), daß im Stadium 23/24 eine Cholinesterase-Aktivität im Knorpelblastem der Extremitätenknospe vorhanden ist. Die Reaktion der embryonalen Zellen der Extremitätenknospe auf Acetylcholin ist daher auf die cholinesteraseaktiven Chondroblasten zurückzuführen. Auch Schmidt fand (1981) durch

Bindungsstudien an diesen Zellen einen embryonalen muskarinischen Rezeptor.

In der vorliegenden Arbeit wird die Ca^{++}-Ausschüttung in embryonalen Zellen nach Reizung des muskarinischen Rezeptors pharmakologisch charakterisiert. Als Zellmaterial wird eine Zellsuspension aus ganzen Embryonen, Embryonen ohne Extremitätenknospen und Extremitätenknospen verwandt. In Vorexperimenten wird der Nachweis der Ca^{++}-Ströme mit Chlortetracyclin weiter optimiert. Anschließend wird die Wirkung einer Reihe von muskarinischen Agonisten und Antagonisten sowie von nikotinischen Substanzen geprüft. Für die wirksamen Pharmaka wird durch Variation der Konzentration das jeweilige Wirkungsoptimum festgestellt.

2. Material und Methode

2.1. Gewinnung der Hühnerembryonen

Es wurden befruchtete Hühnereier (Hybriden, Stamm: weißes Leghorn) von der Geflügelzüchterei "Süd", Schloßgut Laupheim, bezogen. Die 3 1/2 Tage bei 37°C bebrütet wurden, so daß die Embryonen das Stadium 23/24 nach Hamburger & Hamilton (1951) erreichten. Nach Öffnung der Eier erfolgt eine Spülung der Embryonen mit Hankslösung, der 10 mM Hepespuffer zugefügt war. Anschließend wurden die Eihäute unter dem Stereomikroskop entfernt.

2.2. Herstellung der Zellsuspensionen

2.2.1. Aus ganzen Embryonen

Die Embryonen werden mit einem Federscherchen zerkleinert. Danach läßt man 10 ml einer Enzymlösung (die aus einem Gemisch von 5 mg Kollagenase und 10 mg Hyaluronidase ad 10 ml Hankslösung besteht), bei 37°C unter mäßiger Bewegung im Schüttelwasserbad 10 Minuten einwirken. Nun wird die Zellsuspension mit einer Glaskapillare disaggregiert und weitere 10 Minuten nachinkubiert. Danach wird die Zellsuspension 15 Minuten bei Raumtemperatur in 20 ml Trypsininhibitor aus Sojabohnen (10 mg ad 50 ml Hankslösung) inkubiert, anschließend durch einen Nylonfilter mit einer Maschenweite von 30 µm gedrückt, auf Plastikzentrifugenröhrchen verteilt und bei 500 U/min. 15 Minuten zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes mit der Wasserstrahlpumpe wird das Sediment in Minimum Essential Medium (MEM) aufgenommen. Die Menge der MEM-Lösung richtet sich nach der Zellzahl des Sedimentes. Die Zellsuspension wird soweit verdünnt, daß sich eine Zellkonzentration von $5{,}0 \times 10^6$ Zellen/ml ergibt. Im Schüttelwasserbad erfolgt die Aufbewahrung der Zellsuspension bis zum Versuchsbeginn. In Abständen von 15 Minuten werden 1,9 ml der Suspension entnommen und bei 400 U/min. 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer ausgezogenen Glaskapillare entfernt und die Zellen in der Färbelösung aufgenommen.

2.2.2. Aus Extremitätenknospen

Nach Entnahme der Embryonen aus den Eiern und Entfernung der Eihäute wurden alle Extremitätenknospen der Embryonen unter dem Stereomikroskop abgeschnitten. Die weitere Behandlung entsprach der von ganzen Embryonen. Die Anzahl der Embryonen pro Versuchstag betrug 60 im Stadium 23/24 nach Hamburger & Hamilton (1951). Die davon gewonnenen Extremitätenknospen ergaben ca 10 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von $5,0 \times 10^6$ Zellen/ml. Das Volumen reichte für 5 Messungen am Spektralfluorometer aus.

2.2.3. Aus Embryonen ohne Extremitäten

Nachdem die Extremitätenknospen von den Embryonen abgetrennt waren, erfolgte die weitere Aufarbeitung dieser Embryonen zu Zellsuspensionen wie bei den ganzen Embryonen. 60 Embryonen ergaben 19 ml Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von $5,0 \times 10^6$ Zellen/ml, dieses Volumen reichte aus für 10 spektralfluorometrische Messungen.

2.3. Weitere in den Vorversuchen verwendete Isolationsmethoden

2.3.1. EGTA-Methode

Nach der Entfernung der Eihäute wurden die ganzen Embryonen drei Mal mit einer kalten 0,5 M EGTA-Lösung gespült, anschließend mit einem Federscherchen zerkleinert und in ein silikonisiertes Erlenmeyerkölbchen überführt, welches 3 ml kalte 0,5 M EGTA-Lösung enthält. Danach läßt man im Schüttelwasserbad bei mäßiger Bewegung und 0°C diese Lösung 30 Minuten wirken. Die Zellsuspension wird mit einer Haarkapillare disaggregiert. Nach Zupipettieren von 11 ml Trypsininhibitorlösung wirkte diese 15 Minuten im Schüttelwasserbad ein. Die erhaltene Suspension wird durch ein Nylonnetz mit der Massenweite 30 µm filtriert und das gewonnene Filtrat 15 Minuten bei 500 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen in 1 ml Hankslösung aufgenommen. Nach Aufwirbeln der Zellen werden diese gezählt.

2.3.2. Trypsin-Methode

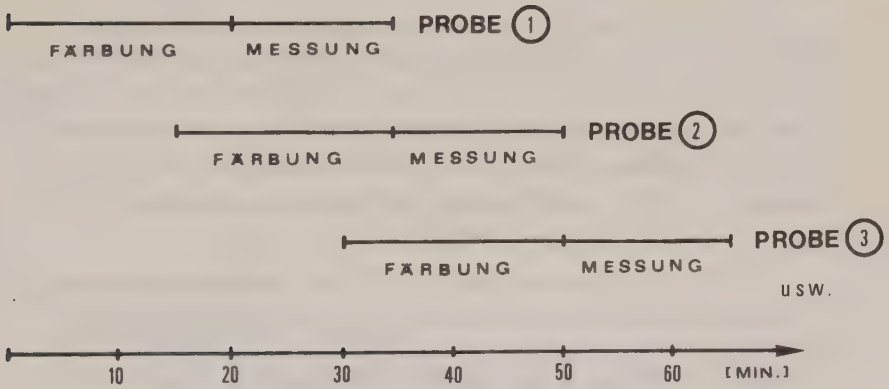
Nach Eröffnung der bebrüteten Eier werden die Embryonen in Hankslösung gelegt, die Eihäute entfernt und die ganzen Embryonen mit kalter Ca^{++}-, Mg^{++} freier Hankslösung gespült. Danach zerkleinert man sie mit einem Federscherchen und überführt die Gewebestückchen in ein silikonisiertes Erlenmeyerkölbchen, das 3 ml 0,1 % Trypsinlösung enthält. Diese läßt man 20 Minuten bei 4°C einwirken. Es folgt eine 15-minütige Inkubation der Gewebelösung im Schüttelwasserbad bei 37°C. Die weiteren Schritte der Aufarbeitung der Zellsuspension sind gleich denen der Isolation mit EGTA.

2.4. Färbevorgang

Die Voraussetzung für die Messung einer Fluoreszenz ist die Entstehung des Ca-CTC-Komplexes. Die Bildung dieses Komplexes wird als Färbevorgang bezeichnet.

Das Sediment der Zellsuspension wird in modifizierter Hankslösung (ohne Natriumhydrogencarbonat und 15 mM Hepespuffer) aufgenommen und mit 50 µl einer $8{,}0 \times 10^{-4}$ M CTC-Lösung versetzt. Der Färbevorgang erfolgt in Eppendorfhütchen unter ständigem Rollen im Inkubator bei 37°C. Unter den gegebenen Bedingungen dauerte dieser Vorgang 20 bis 30 Minuten.

Für eine Messung am Spektralfluorometer wurden 15 Minuten benötigt. Um die Wartezeit für die Zellsuspensionen so kurz wie möglich zu halten, arbeitete ich nach einem Färbe-Zeit-Plan.



Im Gegensatz zum Vorgehen von Kaufenstein (1983) dauerte der Färbevorgang 20 Minuten statt 10 Minuten, die Zeit der Messung am Spektralfluorometer 15 Minuten statt 20 Minuten

2.5. Meßanordnung

Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektralfluorometer der Firma I.S.A. Jobin-Yvon, Longjumeau-Frankreich, Typ JY 3 D gemessen. Angeschlossen war ein Computer der Firma Hewlett-Packard, San Diego - California USA, Typ 9815 A, der auf Grund einer magnetisch aufgezeichneten Software von Jobin Yvon die Intensitätswerte vom Fluorometer abnahm und damit einen Plotter der Firma Hewlett - Packard, Typ 7225 B, steuerte. Bei dem benutzten Programm wurden die Emission in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet bei fixer Exitation und Emission. Dem Computer wurden eingegeben der Einheitsbereich der Intensität und die Dauer der Kurvenaufzeichnung mit dem Zeitabstand, in dem die Meßwerte aufgezeichnet werden sollten.

Nach Herausfinden optimaler Bedingungen für meine Versuchsreihen, ließ ich die Einstellung am Spektralfluorometer für alle Messungen konstant. Spaltblenden: 10 nm, 10 nm, 10 nm, 10 nm, Energie: 5, Integration: 1, Concentration: 10 bei der Grobeinstellung und 3 Umdrehungen der stufenlosen Feinregulierung, (vom linken Anschlag weg nach rechts), Excitation: 389 nm, Emission: 529 nm.

Die Zellsuspension befand sich zur Messung in einer 4 ml-Quarz-Küvette und wurde durch einen Magnetrührer (Stellung 2) in Bewegung gehalten. Ein Wasserbad mit einem Thermostat und Pumpe versehen, sorgte für das kontinuierliche Durchströmen des Küvettenhalters mit Wasser von einer Temperatur von 37°C. Nach Erreichen einer konstanten Fluoreszenz der Zellsuspension wurden nun Pharmakalösungen von 20 µl zugegeben mit einer Eppendorfpipette. Dafür mußte der Küvettenraum kurz geöffnet werden, dies beeinflußte den Meßvorgang aber nur unwesentlich.

2.6. Reagenzien

2.6.1. Zur Herstellung der Zellsuspension

- Hankslösung mit 10mM Hepespuffer pH: 7.24 bei 37°C
- Kollagenase-Hyaluronidase in Hankslösung mit 10 mM Hepespuffer 10 ml pH: 7,24 bei 37°C
  Kollagenase 5 mg aus Clostridium histolytikum
  Hyaluronidase 10 mg
  Beide Enzyme von Boehringer Mannheim GmbH
- Trypsininhibitorlösung: Trypsininhibitor aus Sojabohnen ca 20 IE/mg Firma Serva Heidelberg
  10 mg Trypsininhibitor ad 50 ml Hankslösung mit 10 mM Hepespuffer pH: 7,24 eingestellt bei Raumtemperatur
- Minium Essential Medium (MEM) Boehringer mit Glutaminzusatz: zu 10 ml MEM 0,1 ml 5 % Glutamin pH: 7,40 bei 37°C
- Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer, ohne $NaHCO_3$ pH: 7,37 bei 37°C
- CTC-Lösung: 5,1 mg CTC in Aqua destillata gelöst und titriert auf 7,25 bei Raumtemperatur
  Chlortetracyclin-Hydrochlorid Nr. C-4881
  Firma Sigma St. Louis USA

2.6.2. Pharmaka

Muskarinische Agonisten

- Acetylcholinchlorid 150 mg Portionen Firma Sigma St. Louis USA Nr. A 420 -150
- Arecolinhydrochlorid Firma Sigma A 4506
- Acetyl-ß-methylcholin Firma Sigma Nr. A 2251
- Bethanecholchlorid (Carbamyl-ß-methylcholin) Firma Sigma Nr. C 5259
- Carbachol (Carbamylcholinchlorid) Firma Sigma Nr. C 4382
- Oxotremorin Firma Sigma Nr. 06876

Muskarinische Antagonisten

- Atropinsulfat Firma Merck, Darmstadt Nr. 1575
- Dexetimid Janssen Pharmazeutika Beers, Belgien
- Pirenzepindihydrochlorid Firma K. Thomae Biberach
- Scopolaminhydrochlorid Firma Serva Nr. 77760
- L-Quinuclidinylbenzilat (QNB) Firma Amersham UK Nr. K 52932

Nikotinische Substanzen

- d-Tubocurarin Firma Asta Werke AG Brackwede Nr. 90353
- Dekamethoniumbromid Firma Sigma St. Louis USA Nr. D 1260
- Nikotin Firma Serva Nr. 77635

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche zur Optimierung der Methode

3.1.1. Schonende Isolation der Zellen

Aufbauend auf der Arbeit von Kaufenstein (1983) versuchte ich eine geeignetere Zellisolation herauszufinden, um die Zellausbeute noch zu steigern und die Lebensdauer zu verlängern. Geeignet erschienen mir die EGTA-Methode, die Trypsin-Methode und die Kollagenase-Hyaluronidase-Methode.

Die EGTA-Methode erbrachte eine große Zellausbeute. Nachteilig war, daß die Zellen nach kurzer Zeit (etwa 30 bis 60 Minuten) verklumpten und die Reaktionsbereitschaft auf Acetylcholin nur maximal 2 Stunden betrug.

Die Trypsin-Methode stellte sich für die Zellisolation als wenig geeignet heraus. Die Reaktionsbereitschaft auf Acetylcholin der Zellen betrug 2 bis 3 Stunden und die Zellzahl/ml war gering.

Bei der Kollagenase-Hyaluronidase-Methode war die Isolation der embryonalen Zellen am schonendsten. Sie erbrachte eine gute Zellausbeute und die Zellen zeigten auch nach 4 bis 5 Stunden eine gute Reaktion auf Acetylcholin. (siehe Tabl. 1)

Isolation der Zellen	Zahl der Embryonen	Zellenzahl/ml	Morph. Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop
EGTA-Methode	7	$2,5 \times 10^7$	Zellen stark verklumpt, geringer Anteil von Zellfragmenten
Trypsin-Methode	11	$1,0 \times 10^7$	Zellen gering verklumpt, großer Anteil von Zellfragmenten
Kollagenase-Hyaluronidase-Methode	8	$1,3 \times 10^7$	Zellen gering verklumpt, geringer Anteil von Zellfragmenten

Tabl. 1

3.1.2. Verlängerung der Lebensdauer der Zellen durch geeignete Lagerung und Aufbewahrung in einer Nährlösung bis zum Versuchsbeginn.

Um die Reaktionsbereitschaft der Zellen aus Acetylcholin zu verlängern, die vermutlich durch die Isolation sehr geschädigt sind, setzte ich verschiedene Medien ein. Hiermit wollte ich herausfinden, welche Lösung zur Aufbewahrung der Zellen bis zum Versuchsbeginn am geeignetsten ist.

1. Als erste Lösung verwendete ich Hankslösung mit 10 mM Hepespuffer mit einem pH: 7,3 bei 37°C.

In dieser Lösung wurden die isolierten Zellen im Inkubator unter ständigem Rollen bewegt bis zum Versuchsbeginn. Die mikroskopische Beurteilung ergab eine starke Verklumpung der Zellen schon nach 30 bis 60 Minuten Aufbewahrung in diesem Medium. Dies hatte zur Folge, daß die Streuung der Einzelmeßwerte sehr groß war. Außerdem war der Fluoreszenzintensitätsabfall nach Acetylcholinzugabe zu gering (siehe Abb. 1).

2. Hankslösung mit 10 mM Hepespuffer pH: 7,2 bei 6°C.

Hier wurde die Zellsuspension im Kühlschrank gelagert und durch einen Magnetrührer ständig bewegt. Die Zellverklumpung war geringer als unter den Bedingungen von 1. Diese Lagerung hatte aber den Nachteil, daß durch die niedrige Temperatur der anschließende Färbevorgang sehr unterschiedlich lang war und bis zu 45 Minuten dauerte. (siehe Abb. 1)

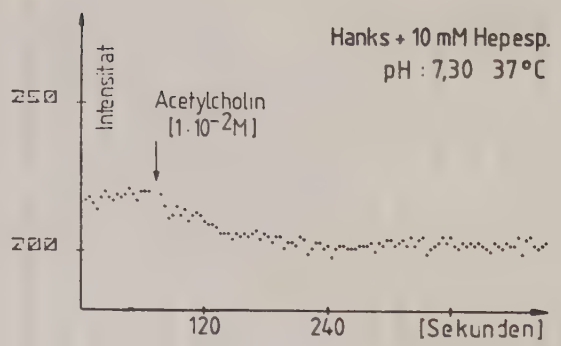
3. Eine weitere Möglichkeit war das Lagern der isolierten Zellen in der Nährlösung Minimum Essential Medium (MEM) bei 37°C im Roller.

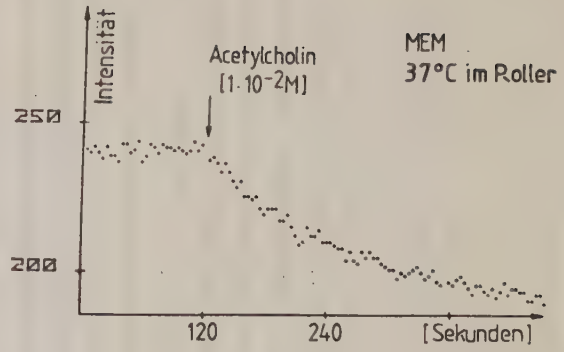
Nach dieser Aufbewahrung der Zellen ergaben sich erstmals nach Acetylcholinzugabe deutliche reproduzierbare Reaktionskurven, die ein Auslaufen in eine Horizontale zeigten. Aber auch hier verklumpten die Zellen nach 40 bis 80 Minuten recht stark, aus der eine große Streuung der Einzelmeßwerte resultierte (siehe Abb. 1).

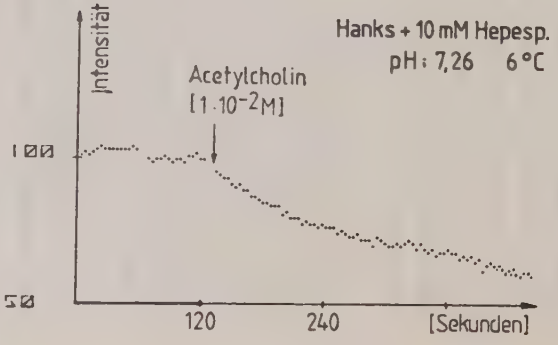
4. Die geeignetste Lagerung war schließlich in der Nährlösung Minimal Essential Medium (MEM) bei 37°C im Schüttelwasserbad unter mäßiger Bewegung in einem Erlenmeyerkölbchen. Hiermit gelang es, die Zellen in einem schwebenden Zustand zu halten. Es kam zu geringer Sedimentation, so daß ein Verklumpen der Zellen minimal war. Die Reaktionskurven nach Zugabe von Acetylcholin waren deutlich und zeigten ein Auslaufen in eine Horizontale. Durch die geringe Verklumpung der Zellen war die Streuung der einzelnen Meßwerte klein. (siehe Abb. 1)

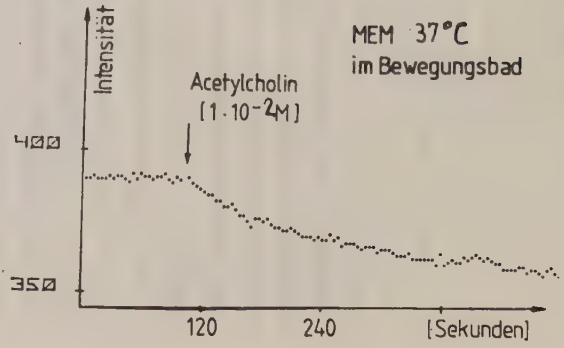
Abb. 1

Einfluß verschiedener Nährlösungen









3.1.3. Optimierung des Färbevorganges

Bei der Anfärbung mit CTC muß die Instabilität der Verbindung beachtet werden.

Das Chlortetracyclin bildet mit 2- und 3-wertigen Kationen Chelat-Komplexe. In feuchter Atmosphäre bei direkter Sonneneinstrahlung zersetzt es sich unter Braunfärbung. CTC ist gut wasserlöslich, gegen Säuren und Laugen instabil. Die Basenempfindlichkeit führt zur Bildung von Iso-Tetracyclinen. Im Bereich von pH-Wert 2 bis 6 kommt es am C_4 zur Epimerisierung. Die Chelatkomplexbildung ist in der Zellsuspension durch Mg^{++} und Ca^{++}-Ionen gegeben, die hauptsächlich membrangebunden sind (Roth 1981).

Aus den chemischen Eigenschaften geht hervor, daß die wässrige Lösung des Chlortetracyclins recht instabil ist. So wurde täglich die Färbelösung (0,8 mM CTC-Lösung) frisch angesetzt, im Dunklen bei Zimmertemperatur aufbewahrt und der pH-Wert auf 7,25 eingestellt.

Die Zellsuspension färbte ich in MEM, in Ca^{++}-, Mg^{++} freier Hankslösung und in modifizierter Hankslösung. Die Modifikation bestand im Ersetzen des Carbonatpuffers durch 15 mM Hepespuffer. Es zeigte sich, daß die Färbezeit in MEM unterschiedlich lang war und bis zu 15 Minuten dauerte. Außerdem konnte keine konstante Fluoreszenzintensität der Zellsuspension erreicht werden.

Bei den Färbeversuchen in Ca^{++}-, Mg^{++} freier Hankslösung war die Färbezeit 20 bis 25 Minuten, wobei es dann sehr rasch zum Fluoreszenzintensitätsabfall kam, so daß die Plateauphase nur 5 bis 15 Minuten betrug.

Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer war das günstigste Färbemedium. Hiermit gelang es, die Färbezeit von 20 bis 25 Minuten recht konstant zu halten. Dies hatte den Vorteil, daß der Färbevorgang außerhalb der Meßküvette ablaufen konnte. Außerdem wurde es dadurch möglich, die Zeit der Plateauphase auf 20 bis 30 Minuten zu verlängern.

Daher entschloß ich mich, den Färbevorgang der Zellsuspension in Hankslösung mit Hepespuffer im Brutschrank bei 37°C unter ständigem Rollen vorzunehmen. Zu 1,9 ml Zellsuspension wurden 50 µl einer $8,0 \times 10^{-4}$ M CTC-Lösung zugegeben, so daß die Endkonzentration des Chlortetracyclins in der Küvette $2,0 \times 10^{-5}$ M betrug.

3.1.4. Geeignetes Meßmedium

Folgende Meßbedingungen waren geeignet: Ein pH-Wert von 7,2, eine geringe Streuung der Einzelmeßwerte, konstante Fluoreszenzintensität der Zellsuspension, deutliche Fluoreszenzintensitätsabnahme nach Zugabe von Acetylcholin und ein Auslaufen der Reaktionskurve in eine Horizontale.

Zur Erreichung dieser geeigneten Bedingungen wurden die Ergebnisse von drei Meßmedien gegenübergestellt. Es waren die Medien Minimum Essential Medium (MEM), Ca^{++}, Mg^{++} freie Hankslösung und Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer.

- MEM als Meßmedium.

Die Versuche ergaben, daß es nicht möglich war, eine konstante Fluoreszenzkurve der Zellsuspension zu erreichen, außerdem blieb die Streuung der Einzelmeßwerte unbefriedigend hoch.

- Ca^{++}, Mg^{++} freie Hankslösung als Meßmedium.

Dieses Medium hatte den Vorteil, daß eine konstante Fluoreszenzkurve der Zellsuspension erreicht wurde und die Streuung der Einzelmeßwerte geringer war im Vergleich zum MEM-Medium. Nach Zugabe von muskarinisch wirksamen Agonisten lief die Reaktionskurve aber nicht in eine Horizontale aus. Dies war bedingt durch ein ständiges Herausdiffundieren des Calciums aus der Zelle, da das Medium Ca^{++} und Mg^{++} frei war.

- Als drittes Medium wählte ich Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer.

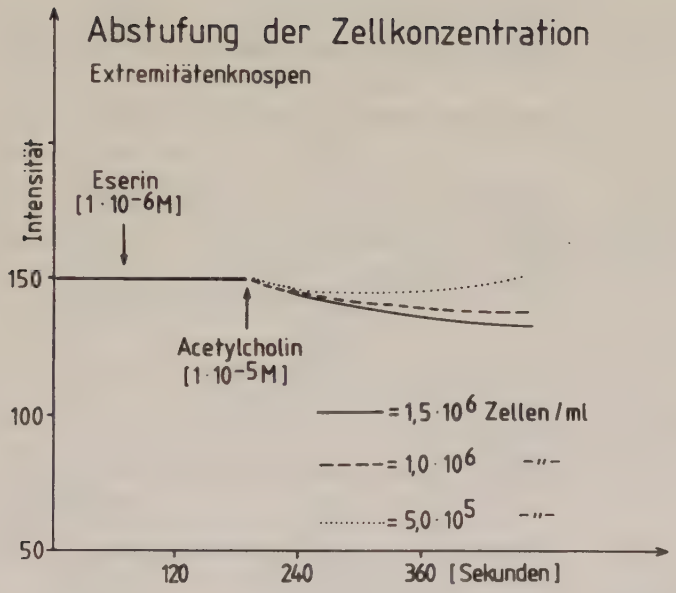
Es zeigte sich eine Stabilisierung des pH-Wertes. Dieser lag jetzt in Grenzen zwischen 6,9 bis 7,3. Außerdem war eine Verringerung der Streuung der Einzelmeßwerte gegenüber den Medien MEM und Ca^{++}, Mg^{++} freier Hankslösung er-

reicht. Die Fluoreszenzintensität der Zellsuspension blieb konstant und die Reaktionskurve lief in eine Horizontale aus.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer als Meßmedium den angestrebten Bedingungen am nächsten kam und bei den weiteren Versuchen verwendet wurde.

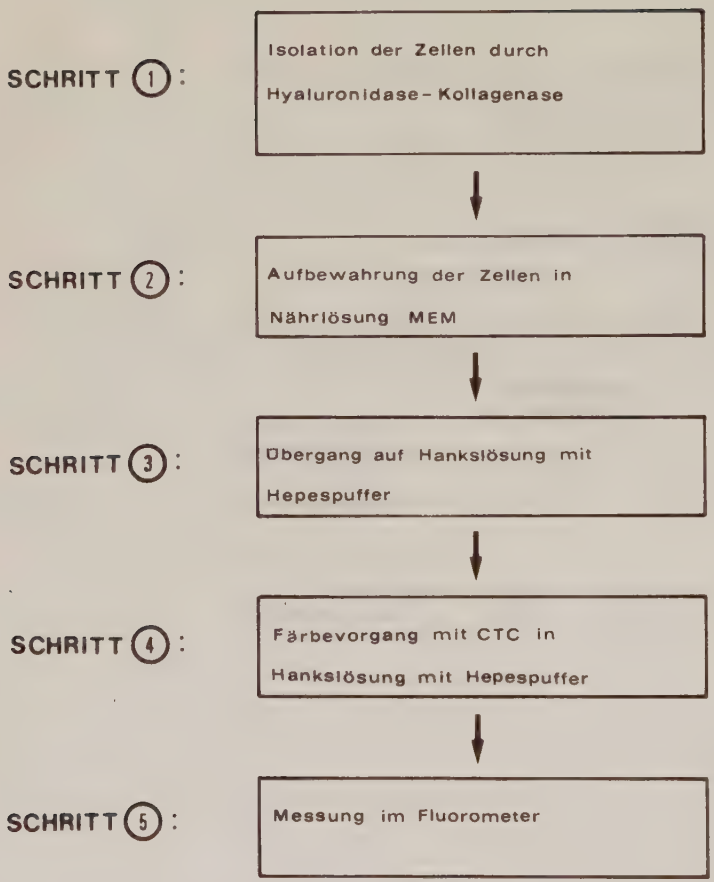
Aus den vorher beschriebenen Versuchsschritten ging hervor, daß eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml eine deutliche Reaktionskurve garantierte (siehe Abb. 2). Die Reaktionsbereitschaft der Zellen auf Acetylcholin betrug jetzt 4 bis 5 Stunden statt 2 bis 3 Stunden, bedingt durch die Aufbewahrung in der Nährlösung MEM bis zum Versuchsbeginn. Die Verbesserung entstand durch Färben der Zellsuspension in Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer. Schließlich wurde eine Stabilisierung der Meßbedingungen erreicht und zwar durch Messen in Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer in pH-Wert-Grenzen zwischen 6,9 bis 7,3.

Die Tabelle 2 zeigt noch einmal die wichtigsten Schritte des Versuchsablaufes.



Die Abb. 2 zeigt die Wirkung von Acetylcholin, Konzentration in der Meßküvette von 1 x 10^{-5} M auf Zellsuspension aus Extremitätenknospen des Hühnchens mit unterschiedlicher Zellzahl/ml.

VERSUCHSABLAUF



Tabl. 2

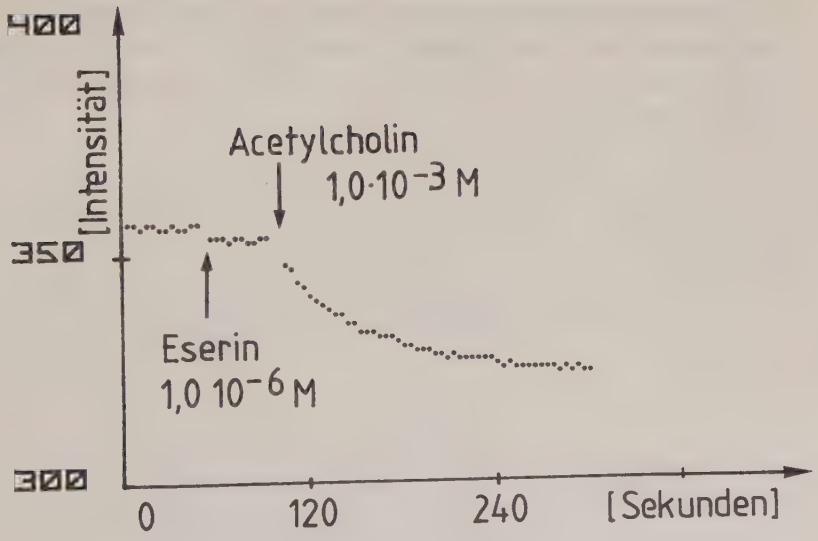
3.2. Cholinerge Substanzen, Pharmaka

3.2.1. Reizung mit Acetylcholin

Durch die Reizung embryonaler Hühnerzellen mit Acetylcholin kommt es nach Inkubation mit dem Ca^{++}-Komplexbildner CTC zu einer Fluoreszenzintensitätsminderung.

Trägt man die Intensität gegen die Zeit auf, so fällt diese nach Reizung mit Acetylcholin so ab, daß der Verlauf einer exponentiellen Kurve entspricht. Das Ende der Reaktion wird angezeigt nach 3 bis 5 Minuten durch Einstellung der Fluoreszenz auf ein niedrigeres konstantes Intensitätsniveau. (siehe Abb. 3)

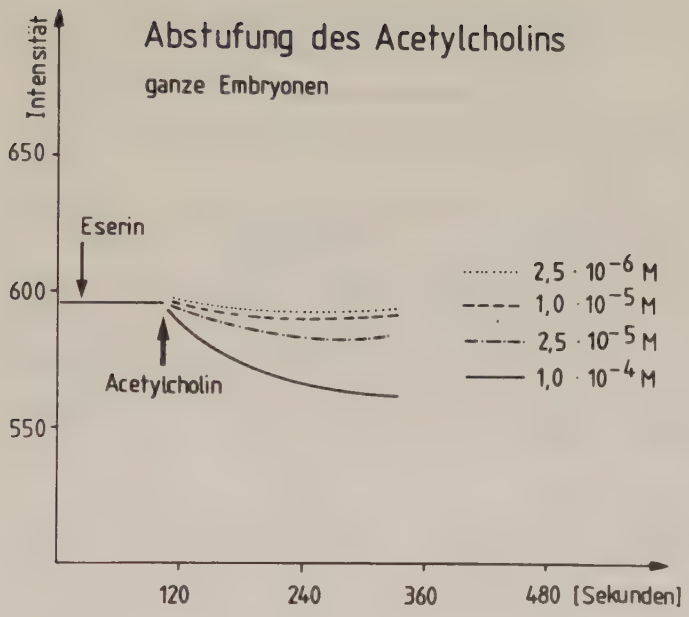
Eine weitere Reizung der embryonalen Zellen mit Acetylcholin in Konzentrationen von $1{,}0 \times 10^{-5}$ bis $1{,}0 \times 10^{-2}$ M konnte keine erneute Reaktion auslösen (Kurve nicht abgebildet).



Die Abb. 3 zeigt die Reaktion embryonaler Hühnerzellen auf Acetylcholin. Die Zellsuspension wurde vor dem Meßvorgang mit 50 µl einer 8,0 x 10^{-4} M CTC-Lösung versetzt, so daß die Endkonzentration in der Küvette 2,0 x 10^{-5} M betrug. An den bezeichneten Zeitpunkten Zugabe von 20 µl einer 1,0 x 10^{-4} M Eserin-Lösung (Endkonzentration in der Küvette 1,0 x 10^{-6} M) und 20 µl einer 1,0 x 10^{-1} M Acetylcholin-Lösung (Endkonzentration in der Küvette 1,0 x 10^{-3} M). Das Meßmedium bestand aus Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer.

3.2.2. Konzentrationsabhängige Abstufung der Acetylcholinreaktion.

Eine Abstufung der Fluoreszenzintensität durch Änderung der Konzentration von Acetylcholin konnte im Bereich von 2,5 x 10^{-6} M bis 1,0 x 10^{-4} M erreicht werden. In Konzentrationsbereichen, die niederer lagen als 2,5 x 10^{-6} M, gab es Fluoreszenzintensitätsminderungen die so gering waren, daß sie in den Bereich eines Verdünnungseffektes oder der normalen Streuung der Einzelmeßwerte fielen. Eine Erhöhung der Acetylcholinkonzentration über 1,0 x 10^{-4} M erbrachte keinen weiteren quantitativen Fluoreszenzintensitätsabfall. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität war in dem untersuchten Bereich von 2,5 x 10^{-6} M bis 1,0 x 10^{-4} M konzentrationsabhängig (Abb. 4).



Die Abb. 4 zeigt eine Übereinanderprojektion von 4 Meßkurven von Zellsuspensionen aus ganzen Embryonen mit $2{,}0 \times 10^{-5}$ M CTC, Eserin $1{,}0 \times 10^{-6}$ M und Zugabe von Acetylcholin in verschiedenen Konzentrationen zum bezeichneten Zeitpunkt. Die Zellkonzentration betrug $5{,}5 - 6{,}5 \times 10^{6}$ Zellen/ml.

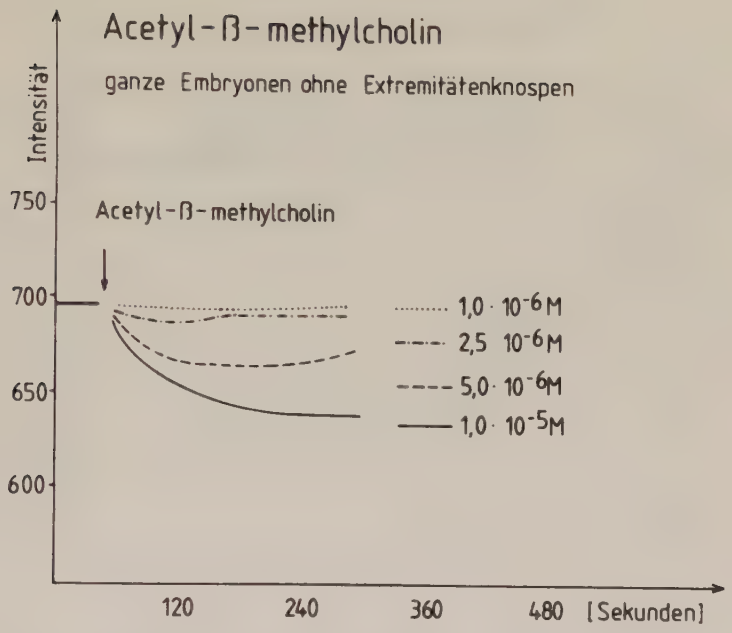
3.2.3. Reizung mit wirksamen muskarinischen Agonisten

3.2.3.a. Acetyl-ß-methylcholin, Carbachol

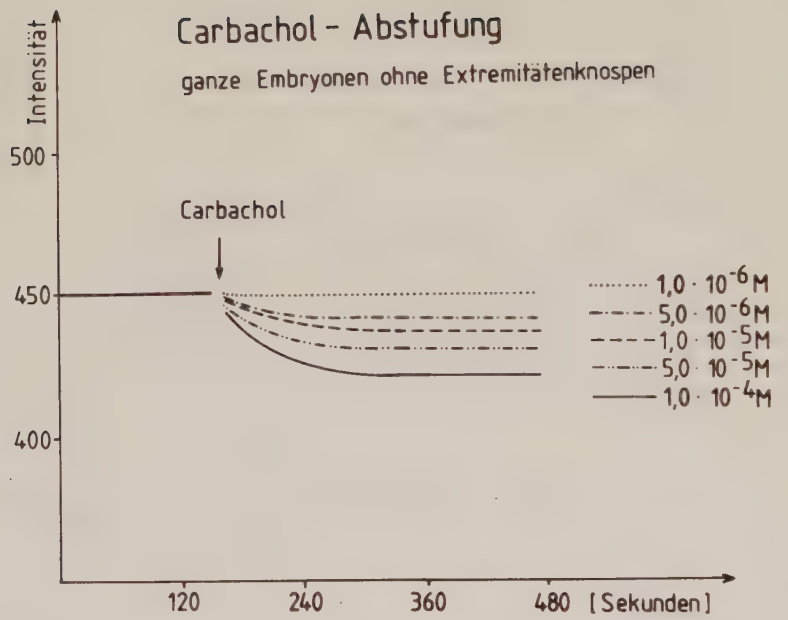
Durch die Reizung der embryonalen Hühnerzellen mit den muskarinischen Agonisten Acetyl-ß-methylcholin und Carbachol in einer Konzentration von $1,0 \times 10^{-3}$ M konnte eine Fluoreszenzintensitätsminderung, entsprechend den Reaktionskurven des Acetylcholins bei gleicher Konzentration, erreicht werden.

3.2.3.b. Konzentrationsabhängige Abstufung der Reaktionskurven der wirksamen Agonisten.

In Konzentrationsbereichen von $1,0 \times 10^{-6}$ M bis $1,0 \times 10^{-5}$ M für Acetyl-ß-methylcholin und für Carbachol von $1,0 \times 10^{-6}$ M bis $1,0 \times 10^{-4}$ M konnte gezeigt werden, daß der Fluoreszenzintensitätsabfall von der molaren Konzentration abhängig ist. (Abb. 5 und 6).



Die Abb. 5 zeigt eine Übereinanderprojektion von 4 Meßkurven von Zellsuspensionen aus ganzen Embryonen ohne Extremitätenknospen mit einer Zellkonzentration von 5×10^{6} Zellen/ml. Das Meßmedium enthält eine CTC-Konzentration von $2{,}0 \times 10^{-5}$ M. Zum bezeichneten Zeitpunkt wurde Acetyl-ß-methylcholin in verschiedenen molaren Konzentrationen zugegeben, so daß die Endkonzentrationen in der Küvette $1{,}0 \times 10^{-6}$ bis $1{,}0 \times 10^{-5}$ M betrugen.

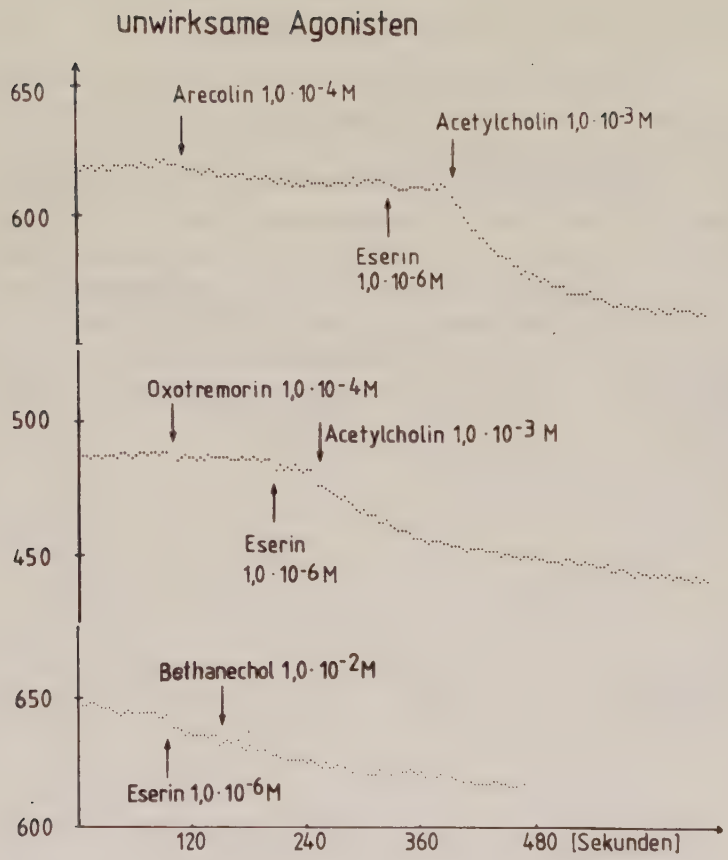


Die Abb. 6 zeigt eine Übereinanderprojektion von 5 Meßkurven von Zellsuspensionen aus ganzen Embryonen ohne Extremitätenknospen mit einer Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml. Das Meßmedium enthält CTC in einer Konzentration von $2{,}0 \times 10^{-5}$ M. Carbachol wurde zum bezeichneten Zeitpunkt in verschiedenen molaren Konzentrationen zugegeben. Die Endkonzentrationen in der Küvette betrugen $1{,}0 \times 10^{-6}$ M bis $1{,}0 \times 10^{-4}$ M.

3.2.4. Reizung mit unwirksamen muskarinischen Agonisten

3.2.4.a. Arecolin, Bethanechol, Oxotremorin

Die Agonisten Arecolin, Bethanechol und Oxotremorin bewirkten in Konzentrationen von $1,0 \times 10^{-4}$ M und $1,0 \times 10^{-2}$ M an embryonalen Hühnerzellen aus allen 3 Präparationen keine Fluoreszenzintensitätsminderung. Durch anschließende Zugabe von Acetylcholin, entsprechend einer Endkonzentration in der Küvette von $1,0 \times 10^{-3}$ M, zu den Zellsuspensionen wurde eine Reaktion ausgelöst. So kann angenommen werden, daß die muskarinischen Agonisten Arecolin, Bethanechol und Oxotremorin in den embryonalen Hühnerzellen keine Ca^{++}-Ströme verursachen wie es Acetylcholin tut (siehe Abb. 7).



Die Abb. 7 zeigt Meßkurven von Zellsuspensionen ganzer Embryonen ohne Extremitätenknospen mit CTC $2{,}0 \times 10^{-5}$ M und die Zugabe von muskarinischen Agonisten an den gekennzeichneten Stellen. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenzintensität in arbiträrer Einteilung angegeben.

Die drei Pharmaka Arecolin, Bethanechol und Oxotremorin zeigten keinen Abfall der Fluoreszenzintensität. Anschließende Reaktionsauslösung durch Zugabe von Acetylcholin entsprechend einer Endkonzentration von 1,0 x 10^{-3} M.

3.2.5. Blockierung der Acetylcholin-Reaktion durch muskarinische Antagonisten

Um zu belegen, daß die Fluoreszenzintensitätsminderung nach Zugabe von Acetylcholin einer tatsächlichen Reaktion am muskarinischen Rezeptor der embryonalen Zellen entspricht, wurde die Zellsuspension vor Zugabe von Acetylcholin mit muskarinischen Antagonisten versetzt.

Ich wählte Atropin in einer Konzentration von 1,0 x 10^{-8} M, Dexetimid 6,8 x 10^{-5} M, Pirenzepin 1,0 x 10^{-4} M, Scopolamin 1,0 x 10^{-6} M und QNB 1,0 x 10^{-7} M. Diese molaren Konzentrationen entsprechen dem 10 bis 100-fachen des K_D-Wertes dieser Antagonisten, so daß man davon ausgehen kann, daß alle muskarinischen Rezeptoren mit ihnen besetzt waren. Die darauf folgende Acetylcholin-Zugabe bewirkte keine Fluoreszenzintensitätsminderung. Dies läßt den Schluß zu, daß keine Reaktion am muskarinischen Rezeptor ausgelöst wurde (siehe Abb. 8).

3.2.5.a. Die Acetylcholin-Reaktion in Abhängigkeit von Konzentrationsabstufungen des Atropins.

Der K_D-Wert des Atropins liegt bei 1,0 x 10^{-9} bis 4,0 x 10^{-9} M. Bei dieser Konzentration kann man davon ausgehen, daß die Hälfte der muskarinischen Rezeptoren durch Atropin besetzt ist und nur eine partielle Wirkung von muskarinischen Agonisten zugelassen wird. Die Abbildung 9 zeigt eine Abstufung der Fluoreszenzintensität einer Acetylcholin-Reaktion in Abhängigkeit von verschiedenen Atropinkonzentrationen.

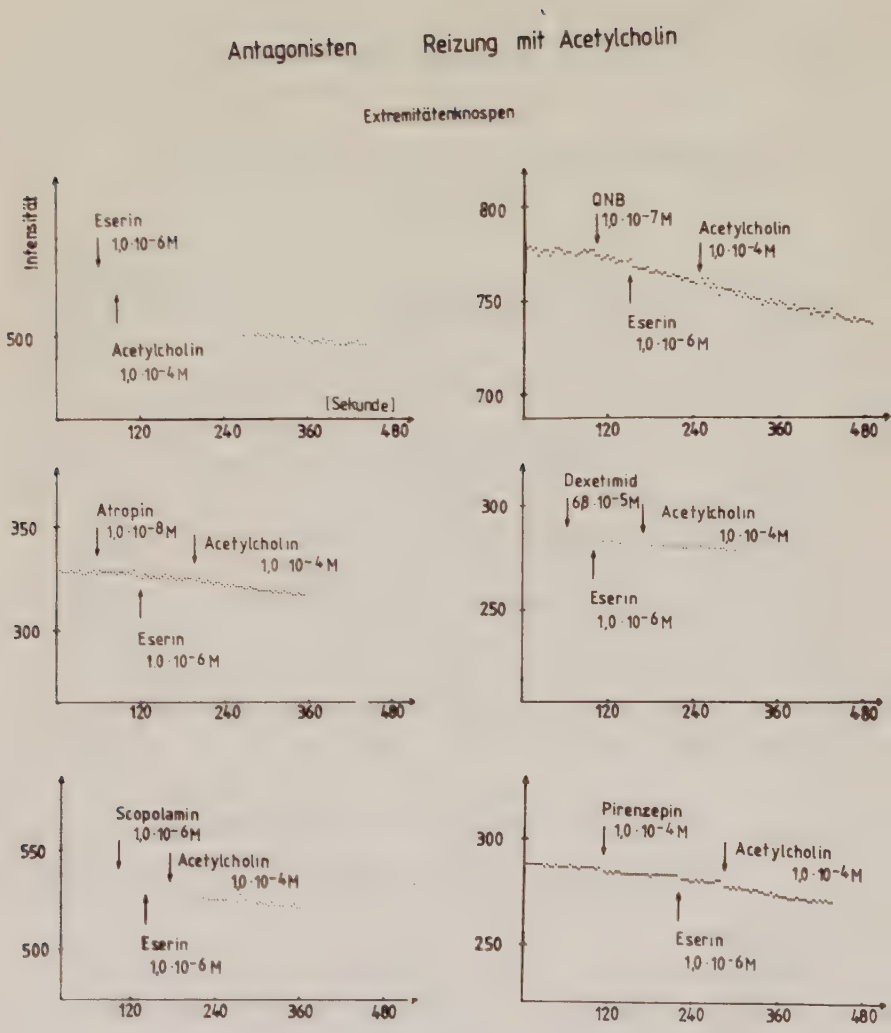

Antagonisten
Reizung mit Acetylcholin
Extremitätenknospen
Intensität
Eserin
1,0·10⁻⁶M
Acetylcholin
1,0·10⁻⁴M
[Sekunde]
500
120
240
360
480
QNB
1,0·10⁻⁷M
Acetylcholin
1,0·10⁻⁴M
Eserin
1,0·10⁻⁶M
800
750
700
Atropin
1,0·10⁻⁸M
Acetylcholin
1,0·10⁻⁴M
Eserin
1,0·10⁻⁶M
350
300
Dexetimid
6,8·10⁻⁵M
Acetylcholin
1,0·10⁻⁴M
Eserin
1,0·10⁻⁶M
300
250
Scopolamin
1,0·10⁻⁶M
Acetylcholin
1,0·10⁻⁴M
Eserin
1,0·10⁻⁶M
550
500
Pirenzepin
1,0·10⁻⁴M
Acetylcholin
1,0·10⁻⁴M
Eserin
1,0·10⁻⁶M
300
250

Abb. 8

Die Abb. 8 zeigt die Hemmung der Reaktion des Acetylcholins an embryonalen Hühnerzellen der Extremitätenknospe durch die muskarinischen Antagonisten Atropin, Scopolamin, QNB, Dexetimid und Pirencepin.

Auf der Ordinate ist die Fluoreszenzintensität in arbiträrer Einteilung angegeben, auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunde aufgetragen.

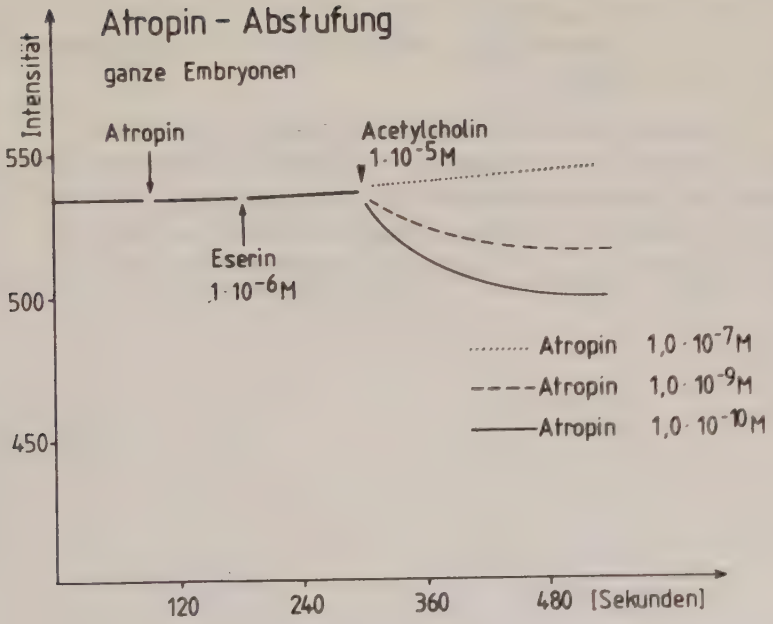


Abb. 9

Die Abb. 9 zeigt die Abstufung des Acetylcholin-Effektes (Endkonzentration von $1,0 \times 10^{-5}$ M) bei unterschiedlichen molaren Atropinkonzentrationen von $1,0 \times 10^{-10}$ M bis $1,0 \times 10^{-7}$ M an Zellsuspensionen aus ganzen Embryonen mit einer Zelldichte von 5×10^{6} Zellen/ml.

3.2.6. Blockierung der Reaktion von Agonisten durch die muskarinischen Antagonisten a bis e von 3.2.5.

Die Agonisten Acetyl-ß-methylcholin und Carbachol zeigten in einer Konzentration von $1,0 \times 10^{-3}$ M gleiche Reaktionskurven wie das Acetylcholin. Um belegen zu können, daß diese Fluoreszenzintensitätsminderung einer tatsächlichen Reaktion an embryonalen Hühnerzellen entspricht, wurde auch hier die Zellsuspension vor Zugabe der Agonisten mit muskarinischen Antagonisten versetzt. Die maximale Wirkkonzentration betrug für Acetyl-ß-methylcholin $1,0 \times 10^{-5}$ M für Carbachol $1,0 \times 10^{-4}$ M. Die minimale Wirkkonzentration lag für Acetyl-ß-methylcholin und Carbachol bei $1,0 \times 10^{-6}$ M.

Als Antagonisten wählte ich Atropin, Scopolamin, QNB, Dexetimid und Pirenzepin in gleichen Konzentrationen wie bei der Reaktionshemmung des Acetylcholins. Es blieb auch hier eine Reaktion der wirksamen Agonisten aus, so daß keine Änderung der Fluoreszenzintensität eintrat.

Antagonisten Reizung mit Acetyl-ß-methylcholin

Extremitätenknospen

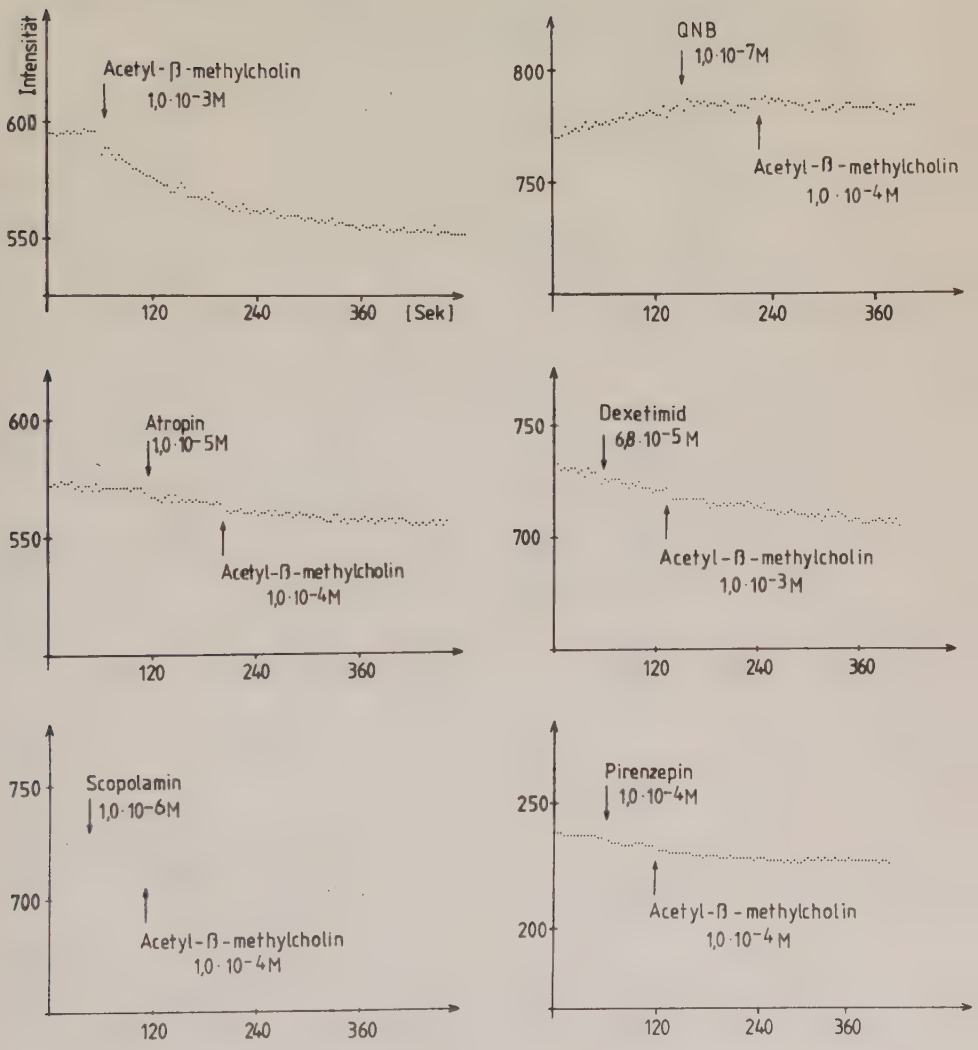


Abb. 10

Die Abb. 10 zeigt die Hemmung der Reaktion des Acetyl-ß-methylcholins an Zellen der Extremitätenknospe durch die muskarinischen Antagonisten Atropin, Scopolamin, QNB, Dexetimid und Pirenzepin.

Auf der Ordinate ist die Fluoreszenzintensität in arbiträrer Einteilung angegeben, auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen.

Antagonisten Reizung mit Carbachol

Extremitätenknospen

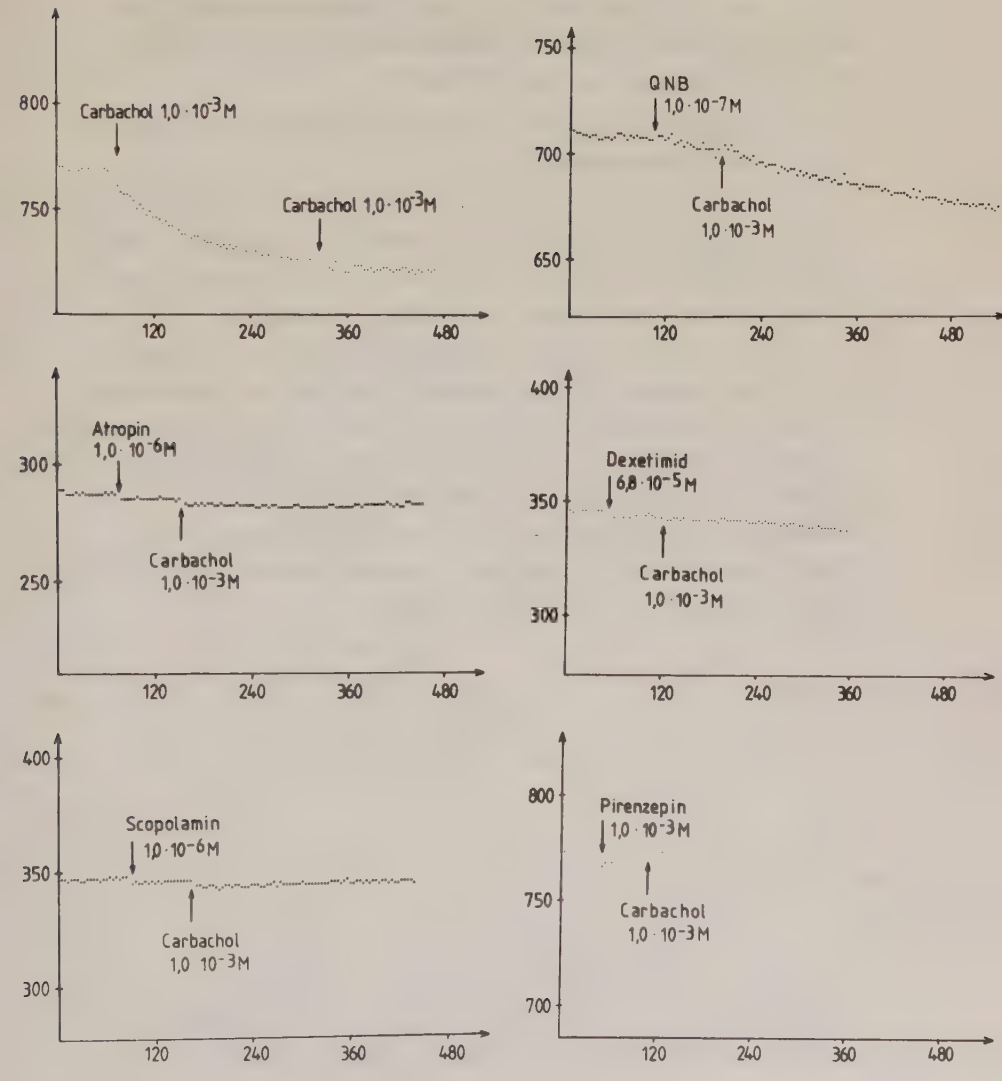


Abb. 11

Die Abb. 11 zeigt die Hemmung der Reaktion des Carbachols an Zellen der Extremitätenknospe durch die muskarinischen Antagonisten Atropin, Scopolamin, QNB, Dexetimid und Pirenzepin.

Auf der Ordinate ist die Fluoreszenzintensität in arbiträrer Einteilung angegeben, auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen.

3.2.7. Beeinflussen nikotinische Substanzen die Reaktion am Muskarinrezeptor?

Um zu prüfen, daß die Reaktion mit den muskarinischen Pharmaka (Acetyl-ß-methylcholin, Carbachol) spezifisch ist für den Muskarinrezeptor, wurden nikotinische Substanzen als Konkurrentliganden eingesetzt.

Als Testsubstanzen wählte ich Nikotin, d-Tubocurarin und Dekamethonium. Nach Ablauf des Färbevorganges wurden die Zellsuspensionen mit einer dieser nikotinischen Liganden vor Zugabe des muskarinischen Agonisten Carbachol versetzt. Die Abbildung 12 zeigt, daß die Reaktion von Carbachol nicht beeinflußt wurde. Das bedeutet, daß Reaktionen am muskarinischen Rezeptor durch nikotinische Substanzen nicht beeinflußt werden.

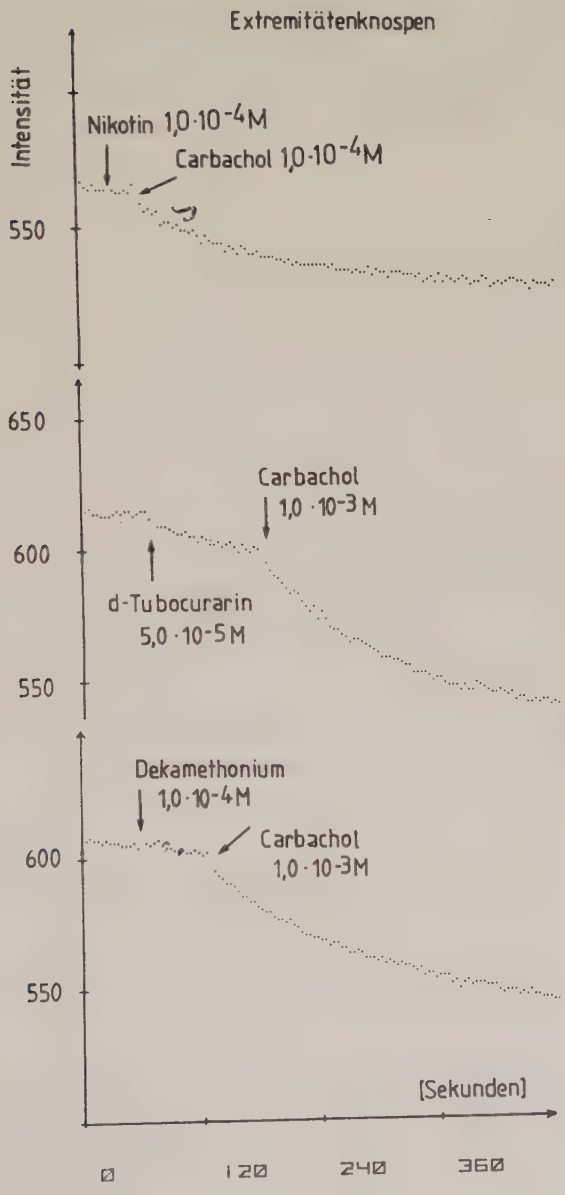

Nikotinische Substanzen
Extremitätenknospen
Intensität
Nikotin 1,0·10⁻⁴M
Carbachol 1,0·10⁻⁴M
550
650
Carbachol
1,0 ·10⁻³M
600
d-Tubocurarin
5,0 ·10⁻⁵M
550
Dekamethonium
1,0·10⁻⁴M
600
Carbachol
1,0·10⁻³M
550
[Sekunden]
0
120
240
360

Abb. 12

Die Abb. 12 zeigt die Reaktion des muskarinischen Agonisten Carbachol an Zellsuspensionen aus embryonalen Hühnerextremitätenknospen. Die Reaktion wurde durch die nikotinischen Substanzen Nikotin, d-Tubocurarin und Dekamethonium nicht beeinflußt.

4. Diskussion

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist in embryonalen Zellen ein muskarinisches Acetylcholin-System vorhanden. Neben der Cholinesterase und Cholin-Acetyl-Transferase besitzen die embryonalen Zellen einen muskarinischen Rezeptor (Reich A., Drews U., Caesar S. 1983). Auf Reizung dieses Rezeptors reagieren die Zellen mit einer Ca^{++}-Verschiebung. Diese Ca^{++}-Verschiebung wurde von Kaufenstein (1983) mit dem Ca^{++}-Komplexbildner Chlortetracyclin an Zellsuspensionen aus Extremitätenknospen des Hühnchens im Stadium 23/24 (Hamburger & Hamilton) sowie an Zellsuspensionen von ganzen Embryonen nachgewiesen.

In der quergestreiften Muskelzelle wird durch die Freisetzung von Ca^{++} aus ihren Speichern, dem endoplasmatischen Retikulum, eine Kontraktion der kontraktilen Elemente bewirkt. Erst durch die Ca^{++}-Freisetzung wird der kontraktile Apparat zur ATP-Spaltung und Verkürzung aktiviert. Auffallend ist, daß die Ausbildung der endoplasmatischen Ca^{++}-Speicher entlang der Myofibrillenbündel um so stärker ist, je dicker die Fasern sind und je schneller die Kontraktionen verlaufen. So verfügen die dicken, rasch reagierenden Skeletmuskelfasern über wesentlich größere intrazelluläre Ca^{++}-Speicher als die Fasern des Myokard's (Keidel 1979).

Weiterhin ist bekannt, daß die Freisetzung von Neurotransmittern wie Acetylcholin, Adrenalin oder Noradrenalin an sympathischen und parasympathischen Synapsen sowie Synapsen im Gehirn unter Zwischenschaltung von Ca^{++}-Ionen zustande kommt. Auch wird Ca^{++} für die Freisetzung von Hypophysenhormonen benötigt, so z.B. für die Exocytose von Adiuretin und Oxytocin aus den Zellen der Neurohypophyse.

So scheint es ein generelles zellphysiologisches Prinzip zu sein, daß Ca^{++}-Ionen immer dann als Mittlersubstanz Verwendung finden, wenn in Abhängigkeit von Erregungsvorgängen an der äußeren Zellmembran intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden sollen (Keidel 1979).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Ca^{++}-Ausschüttung in embryonalen Zellen nach Reizung des muskarinischen Rezeptors pharmakologisch zu untersuchen.
Es stellte sich die Frage: Welche pharmakologischen Eigenschaften besitzt der muskarinische Rezeptor auf embryonalen Hühnerzellen?

Zur pharmakologischen Charakterisierung wurden eine Reihe von muskarinischen und nikotinischen Substanzen eingesetzt (Tabelle 3).

wirksame muskarinische Agonisten:	Acetylcholin, Acetyl-ß-methylcholin, Carbachol.
unwirksame muskarinische Agonisten:	Arecolin, Bethanechol, Oxotremorin.
wirksame muskarinische Antagonisten:	Atropin, Scopolamin, L-Quinuclidinylbenzilat, Dexetimid, Pirenzepin.
unwirksame nikotinische Substanzen:	Nikotin, d-Tubocurarin, Dekamethonium.

Tabl. 3

Nicht alle muskarinischen Agonisten, die ich einsetzte, lösten eine Reaktion an den embryonalen Zellen aus, sondern nur Acetylcholin, Acetyl-ß-methylcholin und Carbachol.

Die Agonisten Arecolin, Bethanechol und Oxotremorin zeigten keine Wirkung. Alle eingesetzten muskarinischen Antagonisten konnten die Auslösung der Ca^{++}-Ausschüttung durch die wirksamen Agonisten unterdrücken.

Nikotin löste die Reaktion selbst nicht aus, beeinflußte jedoch auch die Auslösung durch Carbachol nicht. Die nikotinischen Antagonisten d-Tubocurarin und Dekamethonium waren ebenfalls unwirksam.

Vor Beginn der Meßreihen wurden eine Reihe von Experimenten zur Optimierung der Methode durchgeführt.

Eine Verbesserung der Methode konnte erreicht werden durch die Isolation der embryonalen Zellen mit Kollagenase und Hyaluronidase statt mit Trypsin und Pankreatin (Kaufenstein). Eine Lagerung der isolierten Zellen in der Nährlösung (MEM) bis zum Versuchsbeginn erwies sich als günstig. Der Färbevorgang konnte verbessert werden durch Färben der Zellen in Hankslösung mit 15 mM Hepespuffer.

Auch wurde der Meßvorgang in der gleichen Hankslösung vorgenommen. Dies hatte den Vorteil, daß der pH-Wert im Bereich von 6,9 - 7,3 lag und die Zellen weniger verklumpten. Die Verbesserungen der Methode führten dazu, daß die Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml (Kaufenstein) auf 5×10^6 Zellen/ml in der Zellsuspension herabgesetzt werden konnte. Die Intensitätsabnahme der Fluoreszenz nach Reizung mit Acetylcholin war deutlich größer als unter den von Kaufenstein ausgearbeiteten Versuchsbedingungen.

Die muskarinischen Agonisten Acetyl-ß-methylcholin und Carbachol lösten eine deutliche reproduzierbare Reaktion aus. Es gelang in Konzentrationen von $1{,}0 \times 10^{-6}$ bis $1{,}0 \times 10^{-5}$ M bei Acetyl-ß-methylcholin und bei Carbachol von $1{,}0 \times 10^{-6}$ bis $1{,}0 \times 10^{-4}$ M eine konzentrationsabhängige Intensitätsabnahme der Fluoreszenz zu zeigen (siehe Abb. 5 und 6).

Durch die muskarinischen Antagonisten Atropin, Scopolamin, QNB, Dexetimid, Pirenzepin wurden die Reaktionen beider Pharmaka vollständig blockiert (siehe Abb. 10 und 11).

Bei der Reizung mit den muskarinischen Agonisten Arecolin, Bethanechol und Oxotremorin konnte keine Reaktion ausgelöst werden. Auf anschließende Zugabe von Acetylcholin trat regelmäßig eine Intensitätsabnahme der Fluoreszenz ein (siehe Abb. 7).

Dieser gut reproduzierbare Abfall der Intensität durch Acetylcholin ließ sich durch Blockade der muskarinischen Rezeptoren der embryonalen Zellen mit den muskarinischen

Antagonisten Atropin, Scopolamin, QNB, Dexetimid, Pirenzepin vollständig unterdrücken (siehe Abb. 8).

Auch konnte ich eine partielle Blockade der Acetylcholin-Reaktion mit Atropin in Konzentrationen von $1,0 \times 10^{-10}$ bis $1,0 \times 10^{-7}$ M zeigen (siehe Abb. 9).

Bei der Reizung mit Acetylcholin in Konzentrationen von $2,5 \times 10^{-6}$ bis $1,0 \times 10^{-4}$ M fand ich eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitätsabnahme, die gut reproduzierbar war (siehe Abb. 4).

Die Anwesenheit der nikotinischen Substanzen Nikotin, d-Tubocurarin und Decametonium in einer Konzentration von 1×10^{-4} M und 5×10^{-5} M beeinflußte die Änderung der Fluoreszenzintensität nicht bei Reizung mit Carbachol an embryonalen Zellen der Extremitätenknospe (siehe Abb. 12).

Die muskarinischen Agonisten sind vom molekularen Aufbau gesehen in der Struktur acetylcholinähnliche Verbindungen, bei denen die Carbonylseite verändert ist, die Methylseite aber intakt blieb (Hoppe 1982). Dagegen können die muskarinischen Antagonisten und die nikotinischen Substanzen an beiden Gruppen weitgehend verändert sein.

Ausgehend vom Acetylcholin wurden anfangs Agonisten eingesetzt, die in ihrer molekularen Struktur dem Acetylcholin recht ähnlich waren, wie z.B. Acetyl-ß-methylcholin, Carbachol und Bethanechol. Weiterhin wurden Versuche durchgeführt mit Arecolin und Oxotremorin. Bei diesen handelt es sich um vom Acetylcholin stärker abweichende Moleküle.

Chemisch betrachtet ist das Acetylcholin ein Derivat des Ethanolamins. Der Aminstickstoff weist eine positive Ladung auf, so daß das Acetylcholinmolekül ein Kation ist (siehe Abb. 13).

Acetyl-ß-methylcholin ist ebenfalls ein Kation. Im weiteren Sinne handelt es sich auch hier um ein Derivat des Ethanolamins. Im Gegensatz zum Acetylcholin hat es eine zusätzliche Methylgruppe im Bereich der funktionellen Gruppen und weist dadurch eine sterische Hinderung auf (siehe Abb. 13).

Carbachol ist auch ein Derivat des Ethanolamins. Durch seinen positiv geladenen Aminstickstoff handelt es sich beim Carbacholmolekül ebenfalls um ein Kation. Der Raumbedarf des Moleküls gleicht in erster Nährung dem des Acetylcholins. Die Methylgruppe des Acetylrestes ist durch eine Aminogruppe ersetzt, daraus resultiert aber keine Raumbedarfsänderung, dagegen entstehen Veränderungen der Elektronendichte. Es sind elektronische Effekte innerhalb der Carbonylgruppe denkbar (siehe Abb. 13).

Das Bethanechol ist ein Kation. Es weist sowohl eine sterische Hinderung wie das Acetyl-ß-methylcholinmolekül auf, bedingt durch die Methylgruppe im Bereich der funktionellen Gruppen, als auch eine Verschiebung der Elektronendichte wie das Molekül des Carbachols (siehe Abb. 14).

Arecolin chemisch beschrieben ist ein Kation. Der Stickstoff und der Sauerstoff der funktionellen Gruppen sind um ein C-Atom weiter voneinander entfernt als beim Acetylcholin. Die Esterfunktion ist umgedreht im Vergleich zum Carbachol und Acetyl-ß-methylcholin (siehe Abb. 14).

Beim Oxotremorin handelt es sich um ein starres, planes Molekül. Es ist kein Kation und hat keine Estergruppe. Die Entfernung vom Aminstickstoff zum Amidsauerstoff ist sehr viel größer als bei den vorher beschriebenen Verbindungen (siehe Abb. 14).

Bei den wirksamen Agonisten kann man folgende chemische Gemeinsamkeiten beobachten: Diese Verbindungen sind Kationen. Sie haben eine Estergruppe und sind Derivate des Ethanolamins. Der Stickstoff und der Sauerstoff der funktionellen Gruppen sind durch zwei C-Atome von einander im Molekül entfernt. Sie weisen entweder eine Methylgruppe auf (wie das Acetyl-ß-methylcholin) im Bereich der funktionellen Gruppen, oder die Elektronendichte im Molekül ist verändert (wie im Carbachol-Molekül) in bezug auf das Acetylcholin. Findet man beide Veränderungen im Molekül (wie beim Bethanechol), so ist das Pharmakon nicht wirksam. Es ist denkbar, daß die sterische Hinderung durch die Methylgruppe und die

Veränderung der Elektronendichte zusammen in dieser Verbindung eine Reaktion am muskarinischen Rezeptor unmöglich machen.

Bei den unwirksamen Verbindungen Arecolin und Oxotremorin handelt es sich um Substanzen, die keine Ethanolaminderivate sind. Sie sind auch keine Kationen. Die Entfernung zwischen dem Sauerstoff und Stickstoff der funktionellen Gruppen ist größer als bei den beschriebenen wirksamen Agonisten.

Die muskarinischen Antagognisten Atropin, Scopolamin, QNB, Dexetimid und Pirenzepin waren in der Lage, die Ca^{++}-Ausschüttung zu blockieren (siehe Abb. 15 + 16).

Wurden sie bei den wirksamen Agonisten Acetylcholin, Acetyl-ß-methylcholin und Carbachol vor der Zugabe dieser Agonisten der Zellsuspension in geeigneter Konzentration zugegeben, dem 100-fachen des K_D-Wertes dieser Substanzen, so kam es zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität. Das bedeutet, es fand keine Ca^{++}-Verschiebung in den embryonalen Zellen statt, da die muskarinischen Rezeptoren durch Antagonisten belegt waren.

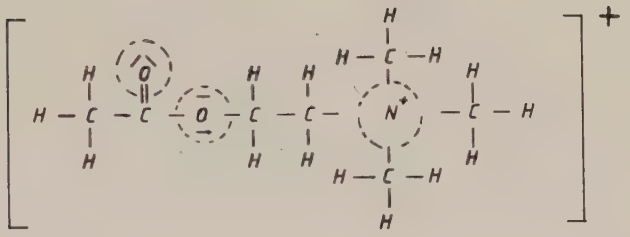
Betrachtet man die molekulare Struktur aller eingesetzten muskarinischen Antagonisten, so handelt es sich um sehr große sperrige Moleküle, die die basischen Zentren der muskarinischen Rezeptoren vermutlich weiträumig abdecken.

Die nikotinischen Substanzen Nikotin, d-Tubocurarin und Dekamethonium waren nicht wirksam (siehe Abb. 17 + 18).

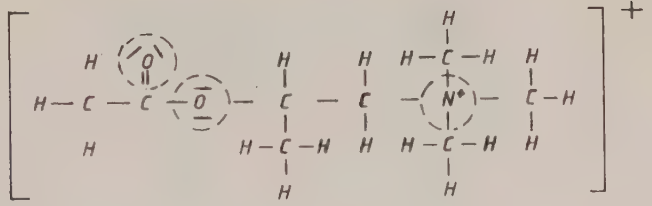
Chemisch betrachtet sind sie keine Derivate des Ethanolamins. Dekamethonium und d-Tubocurarin sind Kationen. Die Substanzen haben zwei positiv geladene Zentren. Von der Struktur her gesehen sind es große, sperrige Moleküle. Auch Nikotin ist kein Derivat des Ethanolamins. Es ist ein 1-Methyl-2-(3-pyridyl)-pyrrolidin. Es hat ein positiv und ein negativ geladenes Zentrum, so daß das gesamte Molekül eine neutrale Verbindung ist.

muskarinische Agonisten

Acetylcholin



Acetyl-ß-methylcholin



Carbachol

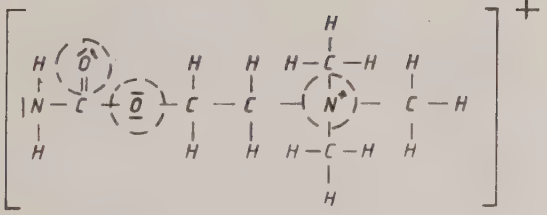
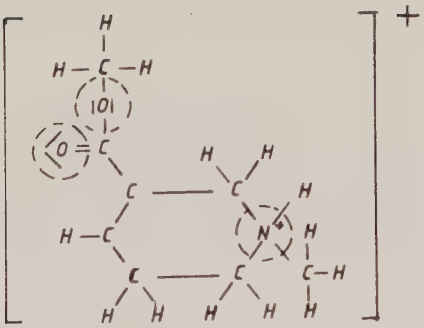
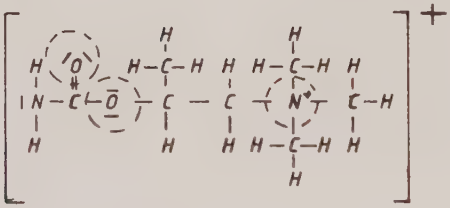


Abb. 13

Arecolin



Bethanechol



Oxotremorin

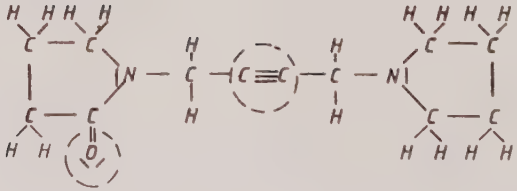
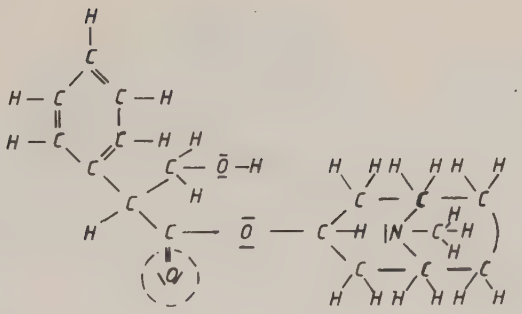


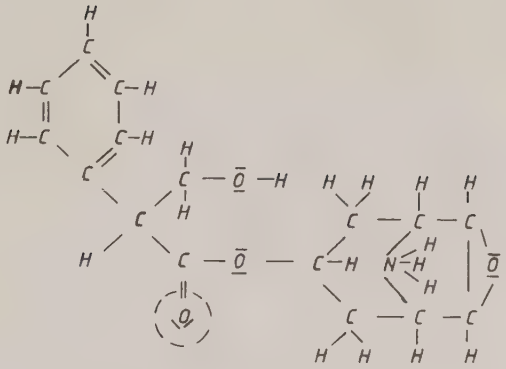
Abb. 14

muskarinische Antagonisten

Atropin



Scopolamin



L-Quinuclidinyl Benzilat (QNB)

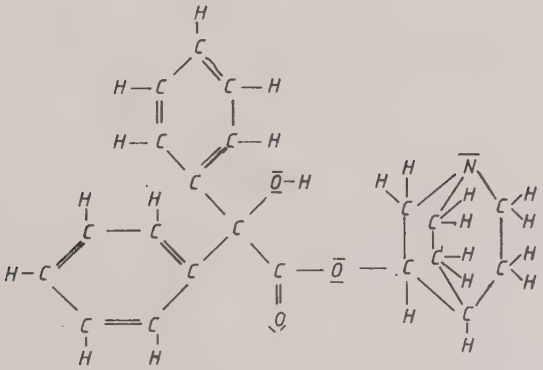
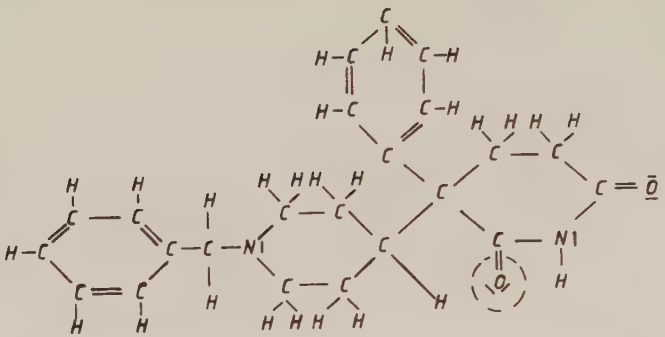


Abb. 15

Dexetimid



Pirenzepin

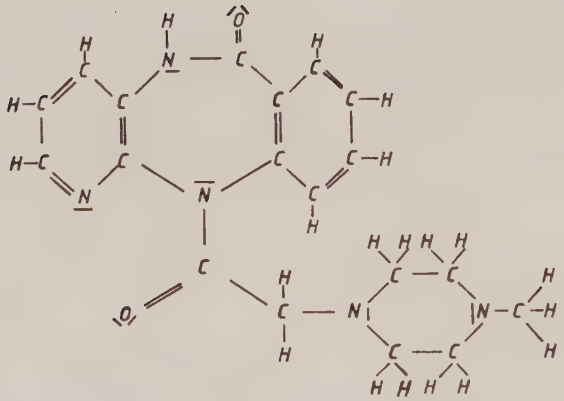
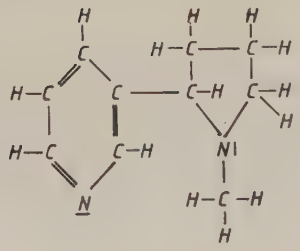


Abb. 16

Nikotinische Substanzen

Nikotin



d-Tubocurarin

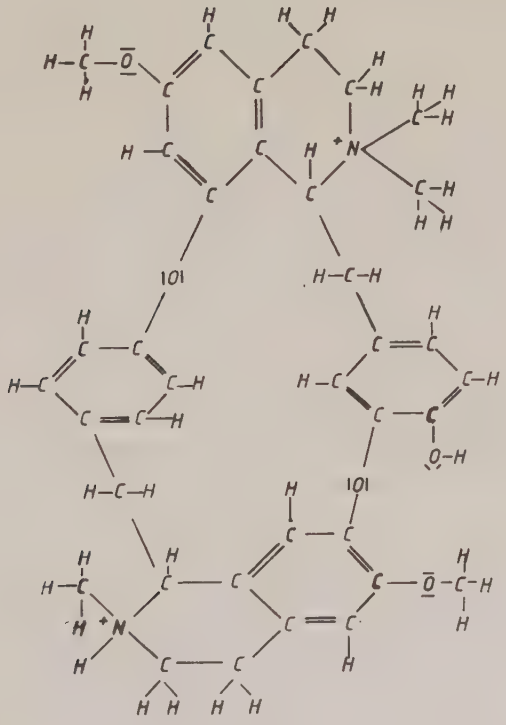


Abb. 17

Dekamethonium

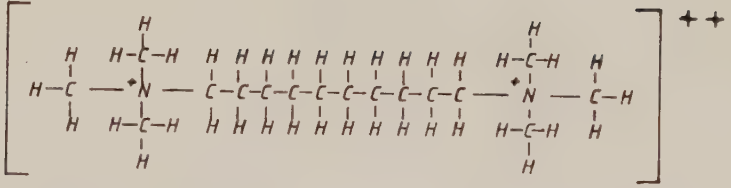


Abb. 18

5. Zusammenfassung

Embryonale Zellen besitzen einen muskarinischen Rezeptor. Auf Reizung des Rezeptors reagieren sie mit einer Ausschüttung von intrazellulärem Ca^{++}. Die Ca^{++}-Ausschüttung läßt sich am Fluorometer nach Färbung der Zellen mit dem Ca-Komplexbildner Chlortetracyclin (CTC) nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Wirkung von muskarinischen Agonisten und Antagonisten auf die Ca^{++}-Ausschüttung in Zellsuspensionen aus Extremitätenknospen des Hühnchens, aus ganzen Embryonen und aus Embryonen ohne Extremitätenknospen untersucht.

Ich erhielt folgende Resultate:

- Die muskarinischen Agonisten Acetylcholin, Acetyl-ß-methylcholin und Carbachol waren wirksam und lösten eine Ca^{++}-Ausschüttung aus. Acetylcholin führte zu einer abstufbaren Reaktion der Zellen im Konzentrationsbereich von $2,5 \times 10^{-6}$ M bis $1,0 \times 10^{-4}$ M, Acetyl-ß-methylcholin im Bereich von $1,0 \times 10^{-6}$ M bis $1,0 \times 10^{-5}$ M und Carbachol im Bereich von $1,0 \times 10^{-6}$ M bis $1,0 \times 10^{-4}$ M.

- Die Agonisten Arecolin, Bethanechol und Oxotremorin waren unwirksam. Ich konnte in Konzentrationen von 1×10^{-5} M bis 1×10^{-1} M keine Ca^{++}-Ausschüttung nachweisen.

- Mit den muskarinischen Antagonisten Atropin, Scopolamin, L-Quniuclidinyl Benzilat (QNB), Dexetimid und Pirenzepin konnte ich die Ca^{++}-Ausschüttung der wirksamen Agonisten unterdrücken. Die hemmende Wirkung war abstufbar für Atropin zwischen $1,0 \times 10^{-10}$ M bis $1,0 \times 10^{-7}$ M.

- Die nikotinischen Substanzen Nikotin, d-Tubocurarin und Dekamethonium waren im Konzentrationsbereich von $5,0 \times 10^{-5}$ M bis $1,0 \times 10^{-4}$ M unwirksam.

Die wirksamen Agonisten zeigen folgende chemische Geimeinsamkeiten:

- Die Verbindungen sind Kationen. Sie sind Derivate des Ethanolamins und besitzen eine Estergruppe. Eine Methylgruppe im Bereich der funktionellen Gruppen (Acetyl-ß-methylcholin) oder eine Amidgruppe am Carbonylrest (Carbachol) behindern die Wirkung nicht. Wenn beide Substituenten vorhanden sind, (Bethanechol) bleibt die Wirkung aus.

6. Literaturverzeichnis

ALLISON, A.C., YOUNG, M.R.: Uptake ot dyes and drugs by living cells in culture. life Sciences 3, 1407 - 1414 (1964)

BABCOCK, D.F., CHEN, J.-L.J., YIP, B.P., LADY, H.Y.: Evidence for mitochondrial localization of the hormone-responsive pool of Ca^{++} in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem. 254, 8117 - 8120 (1979)

BLACKMORE, P.F., BRUMLEY, F.T., MARKS, J.L., EXTON, J.H.: Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output. J. Biol. Chem. 253, 4851 - 4858 (1978)

CASWELL, A.H.: The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescent chelate probe. J. Membr. Biol. 7, 345 - 364 (1972)

CASWELL, A.H.: Methods of measuring intracellular calcium. International Review of Cytology 56, 145 - 181 (1979)

CASWELL, A.H., HUTCHISON, J.D.: Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate: Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 625 - 630 (1971b)

CHANDLER, D.E., WILLIAMS, J.A.: Intracellular divalent cation release in pancreatis acinar cells during stimulus-secretion coupling: 2. Subcellular localization of the fluorescent. J. Cell. Biol. 76, 386 - 399 (1978)

CHEN, J.-L.J., BABCOCK, D.F., LARDY, H.A.: Norepinephrine, vasopressin, glucagon, and A 23187 induce efflux of calcium from an exchangeable pool in isolated rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2234 - 2238 (1978)

DREWS, U.: Cholinesterase in embryonic development. Progress in Histochemistry and Cytochemistry 7/3, Stuttgart, Fischer (1975)

DREWS, U., KUSSÄTHER, E., USADEL, K.H.: Histochemischer Nachweis der Cholinesterase in der Frühentwicklung der Hühnerkeimscheibe. Histochemie 8, 65 - 89 (1967)

DREWS, U., SCHRÖDER Ch., SCHMIDT, H.,JR: Tetratology of the limbs. Merker H.-J., Nau H., Neubert D., Walter de Gruyter & Co., Berlin New York 1980

DU BUY, H.G., SHOWACRE, J.L.: Selective localization of tetracyclin in mitochondria of living cells. Science 133, 196 - 197 (1961)

FLUCK, R.A.: Acetylcholin and acetylcholinesterase activity in early embryo of the medako, oryzias latipes, a teleost. Dev. Growth Differ. 20, 17 - 25 (1978)

HALLETT, M., SCHNEIDER, A.S., CARBONE, E.: Tetracyclin fluorescence as calcium-probe for nerve membrane with some model studies using erythrocyte ghosts. J. Membr. Biol. 10, 31 - 44 (1972)

HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. 88, 49 - 52 (1951)

HOPPE, W., LOHMANN, W., MARKL, H., ZIEGLER, H.: Biophysik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1982

KEIDEL, W.D.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. 5. Auflage, Stuttgart: Thieme 1979

KAUFENSTEIN, Th: Der Nachweis von intrazellulären Kalzium-Verschiebungen mit Chlortetracyclin nach cholinerger Reizung embryonaler Zellen. Der medizinischen Fakultät Tübingen vorgelegte Dissertation.

LUTHRA, R., OLSON, M.S.: Studies of mitochondrial calcium movements using chlorotetracyclin. Biochem. Biophys. Acta, 440, 744 - 758 (1976)

MIKKELSEN, R.B., SCHMIDT-ULLRICH, R.: Concanacalin A induces the release of intracellular Ca^{++} in intact rabbit thymocytes. J. Biol. Chem. 255, 5177 - 5183 (1980)

OZAKI, H.: Molecular properties and differentation of acetylcholinesterase in sea urchin embryos. Dev. Growth Differ. 18, 245 - 257 (1976)

SCHMIDT, H.: Muscarinic acetylcholin receptor in chick limp bud during morphogenesis. Histochemistry 71, 89 - 98 (1981)

SCHRÖDER, C.: Characterization of embryonic cholinesterase in chick limb bud by colorimetry and disk electrophoresis. Histochemistry 69, 243 - 253 (1980)

REICH, A., DREWS, U., CAESAR, S.: Demonstration of Choline-Acetylstransferase in the chick limb bud. Histochemistry in press 1983.

ROTH, H.J., EGER, K., TROSCHUTZ, R.: Arzneistoffanalyse, Pharmazeutische Chemie II, Stuttgart: Thieme 1981

Lebenslauf

Am 29. 9. 1942 wurde ich, Gisa Irmgard Hartung, als Tochter des Chemikers Dr. Hellmut Wintzer und seiner Ehefrau Erika Wintzer, geb. Keutel, in Merseburg geboren.

Nach 8 Jahren Grundschule besuchte ich von 1957 bis 1959 die Mittelschule in Könnern. Es schloß sich eine zweijährige Lehre als Apothekenhelferin an. Von 1961 bis 1963 besuchte ich die Abendoberschule in Magdeburg und legte die Reifeprüfung im Juli 1963 ab. Während der zweijährigen Zeit der Vorimmatrikulation arbeitete ich in den Krankenhäusern in Könnern und in Halle. 1965 nahm ich das Studium für Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität in Halle auf.

Im September 1967 heiratete ich den Diplom-Physiker Reiner Hartung. Wir siedelten nach einem Sommerurlaub in Bulgarien im August 1969 in die Bundesrepublik Deutschland über.

Zunächst war ich 2½ Jahre bei der Firma Adenyl-Chemie, Gerlingen, als Laborantin tätig. Danach absolvierte ich eine zweijährige Ausbildung als Chemisch-technische Assistentin im Chemischen Institut Dr. Flad, Stuttgart. Bis 1976 arbeitete ich als Chemisch-technische Assistentin am Institut für Organische Chemie, Stuttgart.

Durch den Beschluß des Kultusministeriums Baden-Württemberg wurden 1976 das Reifezeugnis und ein Semester meines Medizin-Studiums aus der DDR anerkannt. Ich erhielt die Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen. Nach 11 Semestern legte ich das medizinische Staatsexamen am 28. April 1982 ab.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45